

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Ciências Farmacêuticas

Morgana Fernandes Alecrim

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DA COTININA NO
ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO E ESTUDOS PARA SUA
DETERMINAÇÃO EM SALIVA POR AMPEROMETRIA PULSADA EM FLUXO**

DIAMANTINA

2016

Morgana Fernandes Alecrim

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DA COTININA NO
ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO E ESTUDOS PARA SUA
DETERMINAÇÃO EM SALIVA POR AMPEROMETRIA PULSADA EM FLUXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

**DIAMANTINA
2016**

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM

A366a Alecrim, Morgana Fernandes.
2016 Avaliação do comportamento eletroquímico da cotinina no eletrodo de diamante dopado com boro e estudos para sua determinação em saliva por amperometria pulsada em fluxo / Morgana Fernandes Alecrim. –Diamantina: UFVJM, 2016.
74 p.: il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Wallans Pio Torres dos Santos

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2016.

1. Cotinina. 2. Tabagismo. 3. Amperometria de múltiplos pulsos.
4. Análise por injeção em fluxo. 5. Eletrodo de Diamante dopado com boro.
I. Santos, Wallans Pio Torres dos. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. III. Título.

CDD 543.4

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

Morgana Fernandes Alecrim

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DA COTININA NO
ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO E ESTUDOS PARA SUA
DETERMINAÇÃO EM SALIVA POR AMPEROMETRIA PULSADA EM FLUXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

Data da aprovação: __/__/__

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Munoz - UFU

Prof. Dr. Rafael Machado Dornellas - UFU

Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos - UFVJM
Presidente

DIAMANTINA

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, que com todo amor e dedicação me ensinaram a fazer sempre o melhor;
- Ao Túlio, meu namorado, pelo amor amizade e cuidados dedicados a mim e que foram essenciais por todo esse tempo;
- Aos meus amigos de república que foram maravilhosos e terão sempre um lugar especial na minha vida e nas minhas lembranças;
- Aos amigos do LabVale que são pessoas sensacionais e se tornaram muito queridos em tão pouco tempo. Foi incrível conviver com pessoas tão, companheiras, sinceras e principalmente sutis como vocês...
- Ao “Grupo de estudos do LabVale” por todo o aprendizado;
- Ao Prof. Wallans pela orientação e por contribuir imensamente para o meu crescimento pessoal e profissional.

*“Todas as coisas têm, cada uma, seu lugar natural e para o qual permanentemente se
dirigem”*
ARISTÓTELES

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 O tabagismo	15
1.2 Marcadores biológicos do cigarro.....	17
1.3 Cotinina.....	19
1.4 Métodos para determinação de Cotinina.....	20
1.5 Técnicas eletroanalíticas.....	22
1.5.1 Voltametria Cíclica	23
1.5.2 Voltametria de onda quadrada	24
1.5.3 Amperometria	25
1.5.4 MPA acoplada ao sistema de análise em fluxo	26
1.6 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro	27
 2.0 OBJETIVOS	 29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
 3.0 PARTE EXPERIMENTAL.....	 31
3.1 Instrumentação.....	31
3.1.1 Detecção eletroquímica.....	31
3.1.2 Sistema FIA	32
3.2 Reagentes e soluções	33
3.2.1 Coleta e preparo da Saliva.....	33
3.2.2 Estudo do comportamento eletroquímico.....	34
3.2.3 Otimização dos parâmetros FIA-MPA.....	35
3.2.4 Determinação dos pulsos de potenciais e seus respectivos tempos de aplicação para determinação da CO	35
3.2.5 Determinação da alça de amostragem e vazão do sistema FIA..	35
3.2.6 Escolha do pulso de potencial e tempo de aplicação para limpeza do eletrodo de BDD.....	36
3.2.7 Estudo para avaliar interferência da saliva.....	36
3.2.8 Ensaios de repetibilidade e determinação da faixa linear de	

trabalho.....	37
3.2.9 Estudos dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e ensaio de adição- padrão.....	37
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Caracterização eletroquímica da CO.....	39
4.2 Determinação da CO por FIA-MPA.....	48
4.2.1 Otimização para oxidação da CO.....	49
4.2.2 Otimização para redução da CO	51
4.2.3 Determinação do pulso de potencial e tempo de aplicação para limpeza do eletrodo.....	51
4.2.4 Determinação da vazão e alça de amostragem do sistema FIA..	54
4.2.5 Estudo para avaliar interferência da saliva.....	56
4.2.6 Ensaio de repetibilidade e determinação da faixa linear de trabalho	61
4.2.7 Estudo da faixa linear e dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	62
4.2.8 Estudo de adição-padrão	63
4.3 Comparação entre os métodos para determinação da CO disponíveis na literatura e o FIA-MPA.....	63
5.0 CONCLUSÕES.....	67

RESUMO

ALECRIM, M. F; **Avaliação do comportamento eletroquímico da cotinina no eletrodo de diamante dopado com boro e estudos para sua determinação em saliva por amperometria pulsada em fluxo.** 2016 74p. Dissertação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2016.

A Cotinina (CO) é o principal metabólito da nicotina, sendo utilizada como biomarcador para monitorar a exposição de um indivíduo ao tabaco. Os métodos comumente utilizados para a determinação desse composto em amostras biológicas são baseados na cromatografia líquida, os quais, em geral, são dispendiosos e requerem tratamentos tediosos dessas amostras. Dessa maneira, torna-se necessário o desenvolvimento de novos métodos mais simples e rápidos para determinação da CO. Nesse contexto, o presente trabalho propõe o uso eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) para detecção e caracterização eletroquímica da CO por técnicas voltamétricas, bem como sua quantificação em amostras de saliva por meio da amperometria de múltiplos pulsos (MPA) em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA). Em meio de tampão fosfato a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) a CO apresentou dois processos eletroquímicos, um anódico em $+1,8 \text{ V}$ e um catódico em $-1,2 \text{ V}$ (vs. Ag/ AgCl), sendo o segundo dependente do primeiro e ambos de caráter irreversível. Foi verificado que o processo de transporte de massas para a oxidação da CO é preferencialmente difusional sobre o eletrodo de BDD e que 2 elétrons e prótons estão envolvidos na reação eletroquímica. O coeficiente de difusão calculado para a CO foi de $5,7 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Para determinação da CO em saliva, MPA foi utilizada aplicando-se 4 pulsos de potencial, sendo: (1) em $+1,8 \text{ V}$ / 400 ms potencial gerador (E_G) para oxidação da CO; (2) em $-1,0 \text{ V}$ / 500 ms potencial para eliminação de interferentes na amostra de saliva, (3) em $-1,2 \text{ V}$ / 30 ms potencial coletor para reduzir e quantificar a CO gerada pelo E_G ; (4) em -145 / 300 ms potencial para limpeza da superfície do BDD. A frequência analítica teórica foi obtida de 24 determinações por hora com uma vazão otimizada em $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e a alça de amostragem de $300 \text{ }\mu\text{L}$ no sistema FIA. Além disso, um baixo desvio padrão relativo de 1,46% foi obtido para 10 determinações consecutivas de CO $10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Nessas condições, foi obtida uma faixa linear de 0,5 a $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R= 0,998$) com limite de detecção calculado em $0,18 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para CO. Os estudos de adição e recuperação da CO em amostras de saliva foram de 96,77%, Portanto, mediante a caracterização eletroquímica e os estudos por FIA-MPA usando eletrodo de BDD, este trabalho apresenta uma alternativa simples, rápida e de baixo custo para monitoramento do grau de exposição ao tabaco pela determinação da CO em amostras de saliva.

Palavras-chave: Cotinina. Tabagismo. Amperometria de Múltiplos Pulsos. Análise por Injeção em Fluxo. Eletrodo de Diamante Dopado com Boro.

ABSTRACT

The Cotinine (CO) is the major metabolite of the nicotine and is used as a biomarker to monitor the exposure of an individual to tobacco. The methods commonly used for CO determination in biological samples are based on liquid chromatography, which generally are expensive and require tedious treatments of the samples. Thus, it becomes necessary to develop simpler and faster methods for determining CO. In this context, this paper proposes the use of boron-doped diamond (BDD) film electrode for the detection and electrochemical characterization of CO by voltammetric techniques and, CO quantification in saliva samples by multiple-pulse amperometry (MPA) in analysis by flow injection (FIA) system. In phosphate buffer solution 0.1 mol L⁻¹ (pH 7), the CO presented two electrochemical processes, one anodic at + 1.8V and one cathodic at -1.2V (vs. Ag/ AgCl), with the second process dependent on the first and both irreversible processes. It was found that CO electrochemical processes are controlled by diffusion and, two-protons and two-electrons are involved in the oxidation reaction. The diffusion coefficients calculated for CO was $5.7 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. In determination of CO in saliva samples, the MPA detection was used applying four potential pulses: (1) at +1.8V/ 400ms – generator potential pulse (E_G) for oxidation of CO; (2) at -1.0V/500ms - potential for remove possible interferences, (3) at - 1.2V/30ms - collector potential pulse potential for reduction of the product generated by E_G and CO quantification; (4) at -14.5V/ 300 ms- potential pulse for cleaning BDD electrode. The proposed method obtained a theoretical analytical frequency with 24 determinations per hour by FIA system in flow rate of 3.0 ml min⁻¹ and sample loop of 300µL. Furthermore, a low relative standard deviation of 1.46% was obtained for 10 measurements of CO 10 µmol L⁻¹. Under these conditions, A good linear range from 0.5 to 100 µmol L⁻¹ ($R = 0.998$) was obtained with a detection limit estimated at 0.18 µmol L⁻¹ for CO. The addition and recovery studies of CO in saliva samples were 96.77%. Therefore, this work presents, by the first time, an electrochemical characterization of the CO and a method simple, fast and low cost for monitoring the degree of exposure to tobacco by CO determination in saliva samples using FIA-MPA technique.

Keywords: Cotinine. Exposure to Tobacco. Multiple-Pulse Amperometry. Flow Injection Analysis. Boron-Doped Diamond Electrode.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG	Cromatografia Gasosa
CO	Cotina
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i>
BDD	Diamante Dopado com Boro
DPR	Desvio Padrão Relativo
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
E _c	Potencial Coletor
E _G	Potencial Gerador
E _L	Potencial de Limpeza
FIA	Análise Por Injeção em Fluxo
HPHT	<i>High-pressure/ High-temperature</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MPA	Amperometria de Múltiplos Pulsos
OMS	Organização Mundial de Saúde
RIA	Radio Imunoensaio
UV	Ultra-Violeta
VC	Voltametria Cíclica
VVL	Voltametria de Varredura Linear
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fórmula estrutural da Nicotina.....	17
FIGURA 2: Fórmula estrutural da Cotinina.....	19
FIGURA 3: (A) Modelo de aplicação do potencial para Voltametria Cíclica; (B) Modelo de um voltamograma para um sistema reversível.....	23
FIGURA 4: Esquema de aplicação do pulso em Voltametria de onda quadrada.....	24
FIGURA 5: Esquema de voltamogramas de onda quadrada hipotéticos para (A) Sistemas reversíveis e (B) para sistemas irreversíveis.....	25
FIGURA 6: Potencistato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 128N.....	31
FIGURA 7: Esquema da célula do tipo “ <i>Wall Jet</i> ” utilizada no sistema FIA-MPA...	32
FIGURA 8: Esquema do sistema FIA.....	33
FIGURA 9: Salivette® (A) Tubo que contém as demais estruturas do kit. (B) Rolo cilíndrico de algodão que mede aproximadamente 1cm de espessura e 3,5 cm de comprimento utilizado para coleta de saliva.....	34
FIGURA 10: (A) Variação da corrente de pico obtida por VC em função da variação do pH para os potenciais aplicados -1,2 V e 1,8 V. (B) Voltamogramas cíclicos somente tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,00 (-), com adição da CO 1,0 mmol L ⁻¹	40
FIGURA 11: (A) Voltamogramas cíclicos do eletrólito tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (-); com CO 1,0 mmol L ⁻¹ sob Tratamento catódico (-); com Tratamento anódico (-) e sem tratamento (-). Em detalhe o processo de redução da CO oxidada. (B) Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (-); com CO 1,0 mmol L ⁻¹ com varredura de potencial de -1,5 V a 2,2 V (-) e varredura de potencial de -1,5 a 1,0 V (-).....	41
FIGURA 12: (A) Voltamogramas para CO 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ . (B) Gráfico da corrente da oxidação e da redução em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.....	42
FIGURA 13: Potencial de pico catódico e anódico obtidos dos voltamogramas da CO 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão Britton Robson em função de diferentes pHs.....	43
FIGURA 14: Relação entre a variação da frequência de 20 a 70 Hertz pela corrente de pico anódico, obtido por VOQ. CO 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ . Incremento de potencial de 0,02 V e amplitude de 0,5 V.....	43
FIGURA 15: (A) Voltamograma hidrodinâmico da CO nas concentrações de 0,5 (-) e 0,75 (-) mmol L ⁻¹ . (B) Gráficos Tafel corrigidos para o transporte de massa.....	44

FIGURA 16: Voltamograma de onda quadrada, com varredura de 1,0 a 2,2 V, amplitude de 0,03 V e frequência de 25 Hertz. CO 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹	45
FIGURA 17: Sugestão do Mecanismo de oxidação da CO.....	47
FIGURA 18: Gráfico obtido pela injeção em triplicata de CO 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , detectada pelo método MPA em FIA sobre o eletrodo de DDB. Os pulsos de potenciais aplicados variou de 0,8 a 1,9 V, sendo todos com duração de 100 ms. Vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e alça de amostragem de 150 µL.	50
FIGURA 19: Sinal da corrente de pico de oxidação da CO em função da variação do tempo de aplicação do E _G . O E _G foi fixado em +1,8 V e o tempo de aplicação variado em 100 a 800 ms. Vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e alça de 150 µL.....	50
FIGURA 20: Gráficos obtidos pela média das correntes obtidas por FIA-MPA sobre BDD de soluções padrão de CO 0,5 mmol L ⁻¹ injetada em triplicata. E _G de 1,8 V por 400 ms e E _C variando de -0,8 a -1,3 V todos com duração de 30ms. Vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e alça de amostragem de 150 µL.....	51
FIGURA 21: DPRs de 10 injeções consecutivas de CO 0,1 mmol L ⁻¹ em função da corrente gerada em -1,2 V/ 30ms com os seguintes E _L / 100ms: (a) Sem E _L (SE _L); (b) -1,25; (c) -1,30; (d) -1,35; (e) -1,40; (f) -1,45 e (g) -1,50 V. Vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e alça de amostragem de 150 µL. E _G de 1,8 V por 400 ms.	52
FIGURA 22: Corrente catódica da CO em -1,2 V/ 30ms. E _G 1,8 V/ 400 ms, E _L -1,45 V/ 300 ms (A) Corrente catódica em função da variação da vazão de 0,5 à 4,0 mL min ⁻¹ com alça de 150 µL. (B) Corrente catódica em função do volume da alça de amostragem variado de 50 à 400 µL ¹ , vazão de 3,0 mL min ⁻¹	55
FIGURA 23: Amperograma obtidos por FIA-MPA com injeções em duplicata das soluções contendo apenas uma solução padrão da CO na concentração de 0,1 mmol L ⁻¹ , apenas saliva diluída 10 vezes e por último a saliva diluída e solução padrão da CO. As condições de análise são apresentadas na Tabela 2.....	57
FIGURA 24: Amperograma obtidos por FIA-MPA com injeções em duplicata das soluções contendo apenas CO na concentração de 0,1 mmol L ⁻¹ , apenas saliva tratada com NaOH diluída 10 vezes e por último os dois juntos. Demais condições são apresentadas na tabela 2.....	58
FIGURA 25: Gráficos contendo os sinais de corrente máximo obtido para -1,2 V. (A) Otimização do tempo de aplicação do potencial de -1,0 V testados em 300, 500, 600 e 900 ms. (B) Otimização do tempo de aplicação do potencial -1,2 V. Estudos feitos em FIA-MPA com injeções em triplicata de saliva diluída 10 vezes. Pulso de potencial gerador em +1,8 V por 400 ms e vazão de 3,0 mL min ⁻¹ e alça de 300 µL....	59
FIGURA 26: Amperograma obtido por FIA-MPA com injeções em duplicata das soluções contendo apenas CO na concentração de 0,1 mol L ⁻¹ , apenas saliva tratada com NaOH diluída 10 vezes e por último os dois juntos. Análise aplicando um novo	

pulso de potencial em -1,0V/ 600 ms e o tempo do E_c alterado para 500 ms. As demais condições são as mesmas das Figuras 23 e 24..... 60

FIGURA 27: Amperograma obtido pela detecção por FIA-MPA de 10 injeções consecutivas de CO $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Vazão utilizada de $3,0 \text{ ml min}^{-1}$ e alça de amostragem de $300 \mu\text{L}$ 61

FIGURA 28: (A) FIAGrama obtido pelo sistema MPA-FIA de soluções padrão de CO nas concentrações de: (a) 0,8; (b) 5,0; (c) 10,0; (d) 50,0 e (e) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Vazão utilizada de $3,0 \text{ min}^{-1}$ e alça de amostragem de $300 \mu\text{L}$. (B) Curva analítica..... 62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Propriedades Fisico-químicas da CO.....	19
TABELA 2: Parâmetros otimizados para a detecção de CO por FIA-MPA em tampão fosfato 0,1M.....	55
TABELA 3: Estudo de adição-padrão.....	63
TABELA 4: Métodos para detecção da CO em amostras e limites de detecção.....	64
TABELA 5: Resultados para a determinação da nicotina e cotinina pelos métodos eletroquímicos disponíveis.....	64

TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO

ARTIGOS PUBLICADOS

1. GUEDES, TIAGO DE JESUS, ALECRIM, MORGANA F., OLIVEIRA, FERNANDO M., LIMA, AMANDA B., BARBOSA, SANDRO L., DOS SANTOS, WALLANS T. **Determination of prazosin in pharmaceutical samples by flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection using boron-doped diamond electrode.** Journal of Solid State Electrochemistry. 2015.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. Alecrim, M. F.; Guedes, T. J.; Lima, A. B.; Andrade, G. A. R.; Moreira, D. A. R.; Mendonça, V. A.; Neves, C. D. C.; Lacerda, A. C.; Dos Santos, W. T. P. **Determinação simples e rápida de Cotinina por amperometria de Múltiplos Pulsos em FIA utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, Uberlândia/MG, 2015.

2. Moreira, D. A. R.; Guedes, T. J.; Andrade, G. A. R.; ALECRIM, M. F.; LIMA, A. B.; Dos Santos, W. T. P. **Determinação de Colchicina em Urina por Amperometria de Múltiplos Pulsos em Sistema FIA usando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma Oral no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, Uberlândia/MG, 2015.

3. Andrade, G. A. R.; Guedes, T. J.; Moreira, D. A. R.; LIMA, A. B.; ALECRIM, M. F.; Dos Santos, W. T. P. **Determinação da Clindamicina em formulações farmacêuticas por Análise em Injeção em Batelada com detecção Amperométrica pulsada usando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, Uberlândia/MG, 2015.

4. Guedes, T. J.; Moreira, D. A. R.; Lima, A. B.; Alecrim, M. F.; Guedes.; Andrade, G. A. R.; Dos Santos, W. T. P. **Determinação de Prazosina em amostras farmacêuticas por Amperometria de Múltiplos Pulsos em FIA utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, Uberlândia/MG, 2015.

5. Lima, A. B., Tolomeu, H. V., Torres, L. M. F. C., Guedes, T. J., Alecrim, M. F., Verly, R. M., dos Santos W. T. P. **Controle da síntese de peptídeos por voltametria de pulso diferencial utilizando eletrodo de diamante dopado com boro,** 2015.

6. Alecrim, M. F.; Guedes, T. J.; dos Santos W. T. P. **Estudos para o Monitoramento da Exposição ao Tabaco por Detecção Eletroquímica da Cotinina em Amostras de Saliva,** 2015.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 O tabagismo

O tabagismo, pelos mais diversos mecanismos, está inserido na patogênese de inúmeras doenças e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), essa é a segunda maior causa de morte em todo mundo (OMS, 2007). Um estudo detalhado feito no Brasil em 2013 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) determinou que a prevalência de usuários de produtos derivados de tabaco, seria de 15,0%, o que equivale a 21,9 milhões de pessoas (IBGE, 2014). Todavia, estudos vêm mostrando que o número de fumantes vem diminuindo a cada ano, o que provavelmente se deve a uma maior conscientização da população em relação aos riscos envolvendo o tabagismo. Além disso, o governo federal vem implementando medidas para combater o tabagismo e a mais recente foi a implementação da Lei dos Ambientes Livres da Fumaça de Tabaco, a qual proíbe o fumo em ambientes coletivos fechados (SILVA, S. T. *et al.*, 2014).

Mesmo com a diminuição do consumo de tabaco e as políticas para combater a exposição de indivíduos à fumaça do cigarro, o número de fumantes ainda é muito alto e, conseqüentemente, os danos causados à saúde humana pelo tabagismo é umas das sérias preocupações da sociedade moderna. De acordo com a *Health and Services* os problemas da exposição à fumaça do cigarro estão associados ao maior risco dessas pessoas desenvolverem doenças como: câncer no pulmão, cavidade oral, laringe, faringe, esôfago, colo do útero e bexiga. Doenças cardiovasculares como hipertensão, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva e doença cardíaca coronária são mais propensas em fumantes; é comum também o surgimento de complicações durante a gravidez havendo também relação com a súbita morte de recém nascidos. Fumantes têm maior probabilidade de sofrer complicações cirúrgicas; desenvolver problemas de infertilidade; úlcera péptica e problemas respiratórios diversos (HEALTH AND SERVICES, 2004). A OMS estima que atualmente o número de mortes decorrentes do uso do cigarro é cerca de 4,9 milhões, sendo que, até em 2030 esse numero pode chegar a 8,3 milhões (OMS, 2007).

Os efeitos nocivos do tabagismo são decorrentes dos mais de 4000 componentes tóxicos presentes na fumaça do cigarro, tais como o formaldeído, acroleína, monóxido de carbono, nicotina, acetaldeído, o cianeto de potássio dentre outros (TAMASHIRO, E. *et al.*, 2009). A nicotina em especial é o componente responsável pela dependência causada pelo

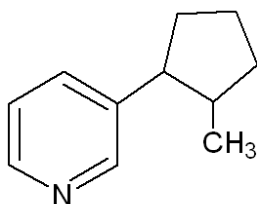
cigarro (HUKKANEN, J.; JACOB, P.; BERNOWITZ, N. L., 2005). Talvez essa dependência possa ser explicada pelo fato do indivíduo se sentir enérgico ao fumar, embora apresente também um relaxamento muscular. Esses resultados estimulantes e depressores causados pela nicotina são decorrentes das ações complexas dessa substância no organismo, que age estimulando e dessensibilizando receptores (GILMAN, G. A.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A., 2003).

A nicotina é um alcalóide encontrado nas folhas do tabaco, sendo este o principal componente do cigarro, que contém em média de 1 à 2 mg desse composto. A nicotina está presente também em alguns alimentos como batata, tomate e berinjela, porém em quantidades muito baixas. (BERNOWITZ, N. L., 1998; HUKKANEN, J.; JACOB, P.; BERNOWITZ, N. L., 2005). A nicotina é comercializada sob diversas formas farmacêuticas como a goma de mascar, emplastro transdérmico, spray nasal e inalador de vapor, todos são utilizados no tratamento de dependentes do cigarro que desejam cessar com o hábito de fumar. Essas formulações têm o objetivo de manter uma concentração plasmática contínua de nicotina, visando amenizar o efeito da abstinência causada pela sua ausência no sangue (GILMAN, G. A.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A., 2003).

A nicotina é rapidamente absorvida pelas vias respiratórias e também através da pele, sendo distribuída por todos os tecidos do corpo. Esse alcalóide se trata de uma base fraca ($pK_a = 8,0$) que em meios ácidos se encontra ionizada, o que reduz consideravelmente a sua absorção através de membranas (HUKKANEN, J.; JACOB, P.; BERNOWITZ, N. L., 2005). A fórmula estrutural da nicotina está apresentada na Figura 1. Dos aditivos colocados pela indústria no cigarro para torná-lo mais palatável, alguns tem a função de melhorar a absorção da nicotina, como a amônia, por exemplo, que aumenta o pH do meio facilitando que ela atravesse membranas. Conforme a literatura, aproximadamente 25% da constituição de um cigarro é de amônia (ROSEMBERG. J.; ROSEMBERG. A. M. A.; DE MORAES, M. A., 2003). Quando a nicotina é inspirada pela fumaça emitida na queima do cigarro, demoram-se apenas 7 segundos para que sejam produzidos os efeitos, os quais são detectados pelo sistema nervoso central (GILMAN, G. A.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A., 2003). Em se tratando de cigarros com o menor teor de nicotina ou presença de filtros, é usual que o fumante manipule sua forma de aspirar a fumaça, de forma a manter o mesmo padrão de consumo da nicotina, havendo assim, um contato maior com os demais componentes tóxicos presentes. Dessa maneira, mesmo em cigarros com baixos teores de nicotina ou presença de filtros, não há uma redução da morbidade causada pelos efeitos do fumo (ROSEMBERG. J.; ROSEMBERG. A.

M. A.; DE MORAES, M. A., 2003). Sendo assim, um controle do grau de exposição direta e indireta à fumaça do cigarro é de extrema importância para se estabelecer os riscos causados pelo tabagismo em diversas situações. Esse grau de exposição pode ser medido por meio de biomarcadores que serão discutidos a seguir.

FIGURA 1: Fórmula estrutural da Nicotina



Fonte: Próprio autor.

1.2 Marcadores biológicos do cigarro

O fumante ativo é aquele que consome de forma regular e contínua o cigarro, enquanto o fumante passivo está apenas em contato com a fumaça emitida durante sua queima. Porém, dependendo do grau de exposição de um fumante passivo ele pode até ser considerado um verdadeiro fumante ativo. Deste modo, existem diversos biomarcadores que permitem determinar se um indivíduo é um fumante ativo ou passivo. O marcador biológico deve ser um composto que evidencia um contato esporádico ou contínuo com a fumaça do cigarro. Um biomarcador ideal deve ter uma meia vida razoável; ser característico para a exposição ambiental ao tabaco; ser de fácil detecção em fluidos biológicos, além de apresentar emissão similar para diferentes formas de consumo (SANTOS, S. R.; STUDART, F. S.; IAMONTI, V., 2008). Há diversos marcadores que podem servir para monitorar os níveis de exposição de um indivíduo à fumaça do cigarro, dentre eles, cabe destacar a nicotina, a cotinina, o tiocianato, o monóxido de carbono, a carboxihemoglobina e também o alumínio.

O monóxido de carbono pode ser medido através do ar expirado possibilitando uma avaliação imediata e não invasiva do indivíduo. No entanto, esse marcador pode sofrer influência de fatores como a poluição ambiental ou ocupacional (MIDDLETON, E. T.; MORICE, A. H., 1999). A carboxihemoglobina é determinada no sangue, e resulta da combinação do monóxido de carbono e a hemoglobina sendo que, quando detectada em níveis elevados pode indicar a exposição à fumaça do cigarro. Nesse caso, além da exposição

ambiental e ocupacional, resultados alterados da carboxihemoglobina na corrente sanguínea podem ser decorrentes também da maneira como fumaça do cigarro é inalada e atividades físicas realizadas pelo indivíduo (SANTOS, S. R.; STUDART, F. S.; IAMONTI, V., 2008). O tiocianato seria outra opção de biomarcador que pode ser utilizado para diferenciar fumantes de não fumantes, e pode ser determinado em saliva, sangue e urina. Porém, sua determinação pode ser influenciada por fatores dietéticos, já que também está presente em diversos alimentos em quantidade suficiente para interferir nos resultados das medições para esse composto (DHAR, P., 2004). Um estudo realizado por Kim Y. J. e colaboradores determinou por meio de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado a variação de alguns metais em amostras de saliva, sendo o alumínio um exemplo de metal que pode servir como marcador biológico do tabagismo (KIM, Y.; KIM, Y. K.; KOH, H., 2010). Essa técnica é pouco empregada não sendo encontrados muitos trabalhos na literatura.

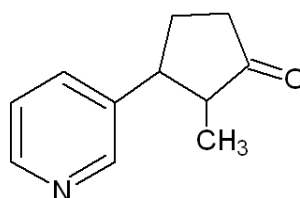
A nicotina não é um biomarcador muito utilizado para verificar o grau de exposição, pois é metabolizada rapidamente pelo fígado em diversos compostos, sendo o principal deles a Cotinina (CO), representando de 70 a 80% do total desses metabólitos. Cerca de 8 a 10 % da nicotina é excretada inalterada pelo organismo e 4 a 7% é metabolizada e excretada como nicotina-N'-óxido e 3 a 5% como nicotina-glucuronide. Existe, no entanto, uma variedade de fatores que interferem no metabolismo e excreção da nicotina no organismo, dentre eles têm-se fatores genéticos que interferem nas enzimas que metabolizam esses compostos, dieta, idade, gênero dentre outros (HUKKANEN, J.; JACOB, P.; BERNOWITZ, N. L., 2005).

O tempo de meia vida da nicotina é de aproximadamente duas horas após ser inalada, sendo que, a CO possui um tempo de meia vida de cerca de dezesseis horas no organismo. Por apresentar maior estabilidade, e sofrer menos influencia de fatores externos, a CO é preferível para ser utilizada como marcador biológico em relação aos demais biomarcadores. Esse fato pode ser confirmado pelos vários trabalhos publicados na literatura, uma vez que, a CO apresenta as características desejáveis de um marcador biológico, sendo realmente a mais utilizada para definir os níveis de exposição à fumaça do cigarro (TANG, E. A. *et al.*, 2013).

1.3 Cotinina

A CO pode ser determinada em amostras de sangue, saliva e urina, sendo que as concentrações encontradas nestas amostras são correspondentes e representativas ao grau de exposição ao tabaco (BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB, P., 2009; TANG, E. A. *et al.*, 2013). A CO pode ser determinada também em amostras de cabelo e unhas, uma vez que, sua quantificação nessas amostras serve para estipular a exposição à fumaça de cigarro por um longo prazo (BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB, P., 2009; KIM, Y.; KIM, Y. K.; KOH, H., 2010). A fórmula estrutural da CO está apresentada na Figura 2. A tabela 1 apresenta as características físico-químicas da CO.

FIGURA 2: Fórmula estrutural da Cotinina



Fonte: Próprio autor.

TABELA 1: Propriedades Físico-químicas da CO.

Formula molecular	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O
Peso molecular	176.2
Temperatura de estocagem	2-8 °C
Temperatura de fusão	48-50 °C
Solubilidade	Etanol (50mg/ml)
pKa	8.0
Condições de estocagem	Evitar a luz

Fonte: Próprio autor.

A quantidade limite de CO que discrimina o fumante ativo, do fumante passivo é de aproximadamente 14, 12 e 50 ng mL⁻¹ para amostras de sangue, saliva e urina respectivamente (PAMPLONA, P.; MENDES, B., 2009). As amostras de urina são mais concentradas para a determinação de CO em relação às amostras de sangue ou saliva. No entanto, amostras de saliva são preferíveis, por ser menos invasiva e de fácil obtenção

comparadas a amostras de urina e saliva (DHAR, P., 2004). A saliva possui diversos biomarcadores como os metais pesados, hormônios, enzimas, proteínas diversas, açúcares e diversos metabólitos para uma variedade de situações. Desta maneira, a saliva, assim como as demais amostras (sangue e urina), requer um cuidado especial para avaliar um indivíduo, ou seja, os possíveis interferentes, de acordo com método escolhido, devem ser devidamente eliminados (KOH, D. S.; KOH, G. C., 2007).

1.4 Métodos para determinação de Cotinina

Conhecer os hábitos tabágicos é clinicamente importante para que se possa reconhecer algum problema em tratamentos realizados pelo paciente, decorrente do uso do cigarro, e a partir disso, seja possível desenvolver medidas mais incisivas de aconselhamento que incentivem o abandono ao tabagismo. A determinação de CO se torna importante nesse contexto por fornecer uma informação confiável, uma vez que, o paciente pode omitir sobre seus hábitos em questionários ou consultas. Alguns pacientes necessitam de um acompanhamento (monitoramento do grau de exposição) e aconselhamento especial, como é o caso dos pacientes com pré-disposição a desenvolver diabetes e mulheres grávidas, que em alguns casos mesmo sabendo dos riscos que envolvem o tabagismo especialmente nessas condições, alguns desses pacientes, costumam não abandonar o cigarro (KOREN, G. *et al.* 2008; WANG, Y. *et al.* 2013). Por todos esses aspectos, a determinação de CO se torna importante por fornecer uma informação real do grau de exposição ao tabagismo, podendo este resultado ser aplicado em diversas situações.

Atualmente, os meios para determinação da CO em amostras biológicas empregam os métodos ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), Radioimunoensaio (RIA) e colorimetria (BYRD, G. D.; DAVIS, R. A.; OGDEN, M. W. *et al.*, 2005; DHAR, P., 2004; YOSHIOKA, N.; DOHI, Y.; YONEMASU, K., 1998). Os métodos cromatográficos também são muito utilizados e dentre os mais empregados podemos destacar: a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) com detector de massas (APINAN, R.; CHOEMUNG, A. KESARA, B., 2010) ou espectrofotométrico no ultra-violeta (UV) (KOBAYASHI, N. *et al.*, 2007); e também Cromatografia Gasosa (CG) com detector de massas (SHIN, H. *et al.*, 2002) ou de condutividade térmica (KUO, H.; YANG, J.; CHIU, M., 2002).

A colorimetria é um método simples e de baixo custo, porém, não apresenta uma especificidade adequada, podendo sofrer interferência de medicamentos que contenham núcleo de piridina como, por exemplo, isoniazida, nicotinamida e ácido nicotínico (DHAR, P., 2004). Os testes imunoenzimáticos RIA e ELISA são considerados, em geral, bons métodos para discriminar fumantes de não fumantes e ambos podem ser empregados em amostras de sangue, saliva e urina. O RIA possui limite de detecção que muda de acordo com o tipo de amostra analisada, podendo variar de 0,5 à 1,0 ng ml^{-1} para amostras de sangue e de 10 à 15 ng ml^{-1} para a amostras de saliva e urina. Este método possui o inconveniente de precisar de equipamentos e reagentes caros, sendo necessários também anticorpos específicos para essa determinação. A técnica baseada no ELISA é indicada para investigações epidemiológicas, uma vez que, combina rapidez na análise, simplicidade de execução e baixo custo. Essa técnica apresenta um limite de detecção de vai de 0,4 à 0,5 ng ml^{-1} para amostras de saliva e urina, no entanto está associada à ocorrência de reações cruzadas com demais metabólitos da nicotina (DHAR, P., 2004; KOBAYASHI, N. *et al.*, 2002; KUO, H.; YANG, J.; CHIU, M., 2002).

Os métodos cromatográficos acoplados aos detectores de massas, de condutividade térmica e UV apresentam diversas vantagens frente aos métodos citados, como: elevada sensibilidade e especificidade mesmo se tratando de amostras complexas. Os limites de detecção são baixos, de 0,1 à 0,8 ng mL^{-1} , além de permitir determinação simultânea de baixas quantidades de nicotina e CO sem interferência da matriz (DHAR, P., 2004; IAN, G. M.; ANDERSON, J. P.; CRISTOPHER, J. P., 1991; KUO, H.; YANG, J.; CHIU, M., 2002; KATAOKA, H. *et al.* 2009; LAFAY, F. *et al.* 2010). Esses métodos, no entanto, apresentam como desvantagens o custo elevado assim como a geração de resíduos orgânicos.

Apesar de todas as técnicas já reportadas para determinação da CO, a busca por métodos mais rápidos e de baixo custo ainda é de grande relevância para análise deste composto. Nessa perspectiva, os métodos eletroanalíticos seriam uma alternativa bastante interessante para quantificação da CO, uma vez que, esses métodos têm se mostrado promissores na determinação de compostos eletroativos, pois apresentam alta seletividade e sensibilidade, além de possibilitar um menor tempo de análise com simplicidade de aplicação, baixo custo e pouca geração de resíduos. Não foi relatado, até o presente momento, nenhum método eletroquímico para detecção e quantificação da CO. Existem, no entanto trabalhos que relatam a determinação da nicotina por meio de voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de BDD e de pasta de carbono (SUFFREDINI, H. B., 2005; STOCES, M.;

SVANCARA, I. S., 2004). Essas técnicas são pouco estudadas e considerando que aproximadamente 75 % da nicotina é excretada como cotinina, destaca-se a importância de se desenvolver estudos para sua determinação de maneira acessível. Sendo assim, o presente trabalho abre a perspectiva da análise de CO por meio de algumas dessas técnicas eletroquímicas, as quais serão brevemente abordadas a seguir.

1.5 Técnicas eletroquímicas

Basicamente as técnicas eletroquímicas relacionam efeitos químicos que ocorrem na superfície do eletrodo com a transferência de elétrons ou carga em uma célula eletroquímica, envolvendo também as propriedades das relações existentes entre a superfície do eletrodo e a solução (BARD, A. J.; FAULKNER, L. R., 1980). De maneira geral, essas técnicas permitem estabelecer relações entre as propriedades elétricas, como por exemplo, potencial, corrente, resistência ou condutividade, com as concentrações de um analito em determinada amostra, sendo assim também denominadas técnicas eletroanalíticas.

Essas técnicas apresentam ampla versatilidade e têm sido aplicadas nos mais diversos ramos de análise com o objetivo de obter informações sobre propriedades e características de determinado composto. A ampla aplicabilidade é demonstrada pela atuação em áreas muito distintas como a química ambiental, biologia molecular, bioquímica, medicina, e físico-química (DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., 2003).

A expansão dos métodos eletroanalíticos na literatura está relacionada às inúmeras vantagens apresentadas por essas técnicas tais como: simplicidade de execução; baixo custo; possibilidade de automação; bem como alta sensibilidade e seletividade; eliminação de etapas tediosas de tratamento de amostras, necessárias em outras técnicas; versatilidade e menor tempo de análise.

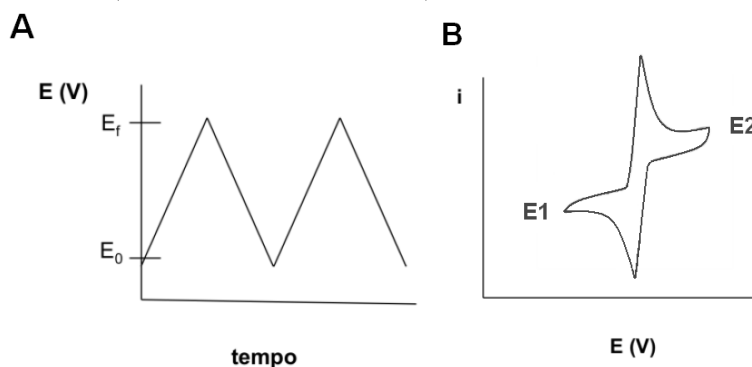
Inicialmente as primeiras técnicas foram as polarográficas (hoje chamadas de voltamétricas), que surgiram fazendo o uso do eletrodo gotejante de mercúrio para realizar medições de correntes. Com o avanço da tecnologia, na década de 50, surgiram as técnicas de pulso que eram mais sensíveis e por isso começaram a substituir a polarografia convencional para quantificar as espécies. As técnicas de pulso se baseiam na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. Portanto, atualmente pode-se dizer que a forma como o pulso de potencial é aplicado, diferencia cada uma das técnicas existentes (DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., 2003). As

técnicas que foram utilizadas neste trabalho, de voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e amperometria de múltiplos pulsos, serão discutidas em seguida.

1.5.1 Voltametria Cíclica

A base das técnicas voltamétricas, iniciadas com um conjunto de procedimentos denominados polarografia, surgiram na Tchecoslováquia em 1922 por Jaroslav Heyrovsky, tendo sua repercussão maior em 1959 com o Prêmio Nobel em Química pelos estudos realizados (PACHECO, W. F. *et al.*, 2013). A voltametria é uma técnica que possibilita obter informações sobre reações de oxidação ou redução em diversas condições, permitindo avaliar qualitativamente e quantitativamente determinado composto. A voltametria cíclica (VC) é geralmente a primeira técnica selecionada na investigação do comportamento eletroquímico de um sistema que contém espécies eletroativas e vem sendo amplamente aplicada em compostos inorgânicos e orgânicos. Essa técnica consiste na aplicação de um potencial que varia entre um valor máximo e mínimo em função do tempo, como pode ser visto na Figura 3. A varredura desse potencial é feita no sentido direto, depois inverso, sendo que os potenciais em que ocorre a mudança de sentido são os potenciais de inversão (E_1 e E_2). Durante a varredura a corrente é medida podendo haver respostas anódicas ou catódicas, o que vai depender do eletrodo de trabalho, da faixa de varredura e do composto que está sendo analisado (PACHECO, W. F. *et al.*, 2013).

FIGURA 3: (A) Modelo de aplicação do potencial para Voltametria Cíclica; (B) Modelo de um voltamograma para um sistema reversível (Pacheco, Semaan et al. 2013).



Fonte: Próprio autor.

A célula eletroquímica em que esses processos ocorrem é composta por três eletrodos, o de trabalho, o de referência e o auxiliar imersos em uma solução de eletrólito suporte. A varredura é feita variando o potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência.

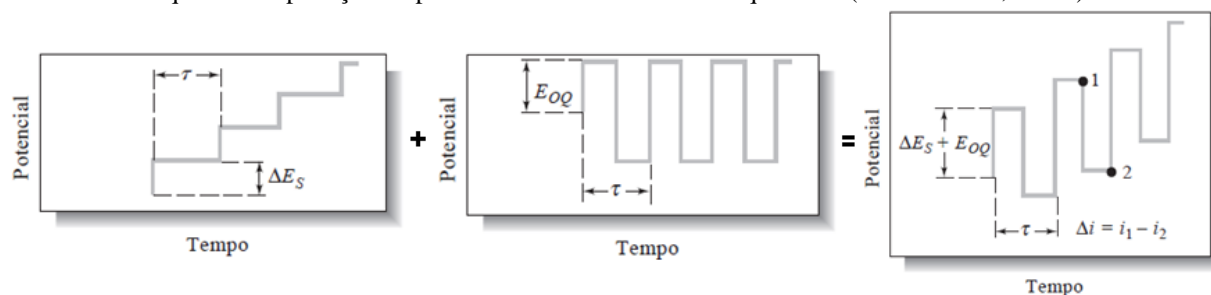
Na superfície do eletrodo de trabalho ocorrem as reações que vão caracterizar o composto analisado (SKOOG *et al.*, 1979). A resistência do eletrodo auxiliar é mantida baixa durante as análises, o que permite a passagem de corrente entre ele e o eletrodo de trabalho.

1.5.2 Voltametria de onda quadrada

Em 1953, Geoffery Barker e colaboradores iniciaram estudos que, posteriormente, seriam continuados por Ramaley e Krause em meados do ano de 1969, para o desenvolvimento da voltametria de onda quadrada (VOQ). Em 1977, Christie, Turner e Osteryoung implementaram mudanças na VOQ, que tornaram possível a aplicação desta técnica para quantificação de analitos eletroativos, sendo hoje, a técnica aplicada para os mais variados fins analíticos (DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., 2003).

O sinal de onda quadrada resulta da aplicação de um potencial em forma de onda quadrada sobreposta a uma variação do potencial em forma de escada. A forma de aplicação do pulso é apresentada na Figura 4. A amplitude do potencial de cada degrau é representada por ΔE_S . O período dos pulsos é representado por (t) . E_{OQ} é a grandeza do pulso. O pulso direto corresponde a corrente i_1 representada pelo potencial 1 e, pulso no sentido inverso gera a corrente i_2 representada pelo potencial 2. As medidas de corrente que dão origem ao voltamograma são as diferenças das correntes obtidas entre o potencial 1 e potencial 2 (SKOOG *et al.* 1979)..

FIGURA 4: Esquema de aplicação do pulso em Voltametria de onda quadrada (SKOOG *et al.*, 1979).

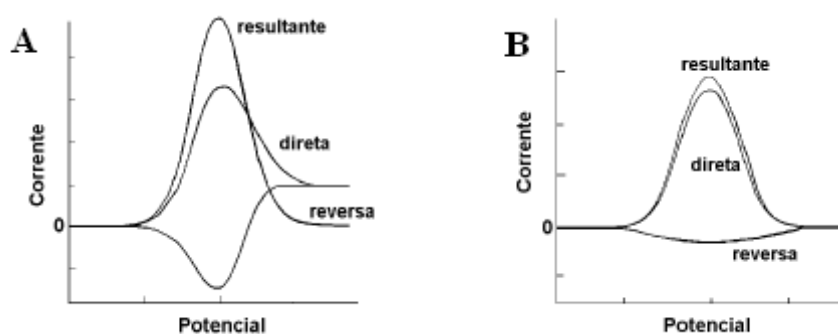


Fonte: SKOOG *et al.*, 1979.

A Figura 5A apresenta um esquema dos voltamogramas de onda quadrada para sistemas reversíveis e na Figura 5B para sistemas irreversíveis. Nos voltamogramas obtidos pela VOQ a corrente direta e reversa, correspondentes aos processos anódicos (ou catódicos) e catódica (ou anódica), respectivamente, podem ser observadas para os processos reversíveis, bem como a corrente resultante (somatória das correntes obtidas). Para os processos

irreversíveis, apenas a corrente direta de um dos processos será monitorada (DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., 2003).

FIGURA 5: Esquema de voltamogramas de onda quadrada hipotéticos para (A) Sistemas reversíveis e (B) para sistemas irreversíveis (DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., 2003).



Fonte: DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., 2003.

1.5.3 Amperometria

A amperometria é uma técnica que vem se destacando, sendo atualmente, a mais empregada em sistemas de análise em fluxo. Nessa técnica, o eletrodo de trabalho permanece em um potencial constante, sendo que, a escolha desse potencial é baseada nos processos eletroquímicos que determinam o comportamento do composto analisado (DOS SANTOS, W. T. P. *et al.*, 2011). A corrente limite decorrente de um potencial aplicado é medida fornecendo o amperograma. Logo após o início do experimento da detecção amperométrica há uma queda da corrente capacitiva (corrente necessária para carregar os eletrodos no potencial desejado), o que possibilita a detecção de correntes faradáicas (corrente gerada pelos processos redox na superfície do eletrodo de trabalho) de baixa magnitude, caracterizando uma maior sensibilidade do método.

No entanto, na amperometria convencional há uma possibilidade de contaminação ou passivação da superfície do eletrodo de trabalho devido à adsorção e/ou eletropolimerização de determinados compostos na sua superfície. Quando ocorre algum desses processos, há uma interferência na taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a espécie eletroativa, comprometendo a estabilidade do sinal gerado. Para contornar esse problema, a Amperometria de Múltiplos Pulsos (que pode ser indicada pela sigla em inglês MPA - *Multiple Pulse Amperometry*) possibilita a aplicação de vários pulsos de potenciais

permitindo, além da determinação do analíto, a aplicação de um potencial que promove a limpeza e reativação da superfície do eletrodo (DOS SANTOS, W. T. P. *et al.*, 2011).

A MPA permite o monitoramento de cada um dos pulsos aplicados, conferindo seletividade à técnica, além de permitir a determinação simultânea e indireta de compostos. A MPA com software atuais pode aplicar e monitorar o sinal de até 10 pulsos de potenciais simultaneamente (DOS SANTOS, W. T. P. *et al.*, 2011).

1.5.4 MPA acoplada ao sistema de análise em fluxo

Em 1975, Růzicka e Hansen desenvolveram os primeiros trabalhos envolvendo o sistema de análise por injeção em fluxo, da sigla em inglês FIA (*Flow Injection Analysis*), que posteriormente veio a ser aplicada em diversos métodos de análise como a absorção atômica, fluorescência, potenciometria, voltametria, amperometria dentre outros (DOS SANTOS, W. T. P. *et al.*, 2011). A técnica MPA acoplada ao sistema FIA é ainda pouco explorada, porém, vem se mostrando eficaz na determinação de alguns compostos farmacêuticos inclusive em amostras biológicas (DOS SANTOS, W. P. T. *et al.*, 2008, 2009; GIMENES, T. D. *et al.*, 2010; GUEDES, T. J. *et al.* 2015; JUNIOR, A. C. L. *et al.*, 2012; LIMA, A. B. *et al.*, 2013).

Dentre as vantagens que a detecção amperométrica acoplada ao sistema FIA apresenta, vale destacar, a alta frequência analítica, possibilidade de automatização do sistema de detecção e amostragem, diminuindo significativamente a geração de resíduos. Esse sistema proporciona também um aumento considerável da sensibilidade na detecção eletroquímica, devido ao maior transporte de massa à superfície do eletrodo em decorrência do fluxo. Além disso, nesse sistema, a substância eletroativa permanece por menor tempo em contato com a superfície do eletrodo, o que minimiza o efeito de contaminação do mesmo, gerando uma maior estabilidade do sinal analítico obtido (DOS SANTOS, W. P. T. *et al.*, 2011).

Alguns parâmetros do sistema de detecção FIA-MPA precisam ser otimizados de modo que, a corrente limite obtida seja a maior possível permitindo que o sistema determine os compostos com a sensibilidade desejada. Esses parâmetros consistem na otimização da vazão, volume de amostragem, escolha do pulso de potencial e tempo de duração dos pulsos, sendo esta discussão abordada numa revisão publicada por dos Santos e colaboradores (DOS SANTOS, W. P. T. *et al.*, 2011). Todo esse sistema de detecção pode ser acoplado a vários tipos de eletrodos de trabalho, como por exemplo, vários tipos de materiais de carbono, ouro, eletrodos impressos, entre outros. Um desses eletrodos utilizados vem se

destacando, o diamante dopado com boro, e uma abordagem deste material é apresentada em sequência.

1.6 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

O primeiro relato do uso do diamante em eletroquímica se deu em 1983, com estudos realizados por Sato, Takahashi e Sakairi, implementando íons de argônio e zinco com diamante. Em 1975 houve início da produção do filme de diamante dopado com boro, da sigla em inglês BDD (Boron-Doped Diamond), e posteriormente em 1992, Fujishima e colaboradores relataram o primeiro experimento eletroanalítico determinando o nitrato de amônia pela redução, utilizando um eletrodo de BDD (FUJISHIMA, A. *et al.* 2005). Com a possibilidade de produção de diamante a um custo mais acessível, sua aplicação em vários seguimentos começou a se expandir, inclusive no ramo da eletroanálise.

A síntese do BDD pode ser a partir de dois métodos, sendo o primeiro e mais utilizado, a síntese por deposição química da fase vapor (*Chemical Vapor Deposition – CVD*) e o segundo, o crescimento sob alta pressão e temperatura (*High-pressure/ High-temperature – HPHT*). A deposição do diamante inicialmente precisava de grãos de diamante para o crescimento. Com o avanço das técnicas supracitadas, outros substratos puderam ser utilizados (DE BARROS, R. C. M. *et al.* 2005). O diamante naturalmente possui características dielétricas, porém, a dopagem confere propriedades semicondutoras a esse material. O filme de diamante pode ser dopado por diferentes concentrações de boro, para dopagem com 10^8 átomos de boro por cm^3 a resistividade é cerca de $10^4 \Omega$, para níveis de dopagem maior com até 10^{21} átomos de boro a resistividade é de $10^{-3} \Omega$. A dopagem pode ser feita também por outros compostos como o enxofre, nitrogênio, fósforo e lítio (PANIZZA, M.; CERISOLA, G., 2005).

O eletrodo de BDD vem sendo aplicado com sucesso em diversas análises, devido às vantagens como: apresentar uma ampla janela de trabalho, permitindo que uma gama maior de potenciais sejam aplicados; grande estabilidade à corrosão; apresenta superfície inerte com baixa capacidade de adsorção; baixa tendência a ser desativado; além de baixa capacitância da dupla camada elétrica, que gera baixa corrente capacitiva e pode proporcionar análises mais sensíveis (PANIZZA, M.; CERISOLA, G., 2005) ..

Assim, considerando uma boa potencialidade para aplicação do eletrodo de BDD, o presente trabalho apresenta a possibilidade de detecção e aplicação de um método simples,

rápido e de baixo custo para monitoramento do grau de exposição ao tabagismo pela determinação da CO por FIA-MPA usando o eletrodo de BDD.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi caracterizar o comportamento da CO por métodos eletroquímicos e desenvolver um método por FIA-MPA usando um eletrodo de BDD para determinação desse composto em amostras de saliva. O desenvolvimento deste estudo teve como meta a aplicação de um método rápido, simples e de baixo custo para quantificação de CO com alta sensibilidade e seletividade, além de uma elevada reprodutibilidade e frequência analítica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento eletroquímico da CO por meio de estudos envolvendo VC utilizando eletrodo de BDD;
- Determinar o número de elétrons envolvidos nas reações da CO utilizando eletrodo de BDD;
- Otimizar os parâmetros da detecção MPA em FIA, tais como: vazão, volume de amostragem, potenciais de detecção e limpeza e os tempos de aplicação dos pulsos de potenciais;
- Otimizar os parâmetros analíticos para determinação da CO, como: repetibilidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e quantificação;
- Investigar a possibilidade de determinação da CO em amostras de saliva eliminando possíveis interferentes;
- Realizar estudos de adição-recuperação de CO em amostras de saliva;

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

3.1.1 Detecção eletroquímica

Todos os estudos eletroquímicos foram feitos utilizando-se um potenciostato/galvanostato da Auto lab modelo PGSTAT 128N (Eco ChemieMethrom) acoplado a um microcomputador contendo o software GPES 4.9 (Figura 6).

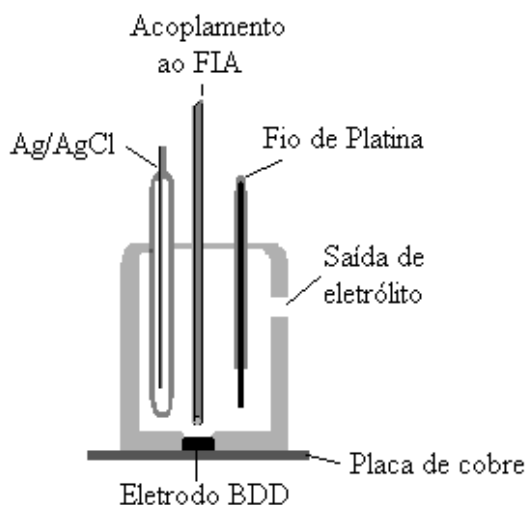
FIGURA 6: Potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 128N.



Fonte: Próprio autor.

A célula eletroquímica em fluxo utilizada nas análises foi fabricada no próprio laboratório. A célula é do tipo “*wall Jet*” e consiste de um tubo de teflon, com capacidade de aproximadamente 10,0 mL, um esquema da célula é apresentado na Figura 7. Ela apresenta cinco orifícios sendo três de entrada para eletrodos, uma para entrada da solução proveniente do sistema FIA e, por último um orifício de saída do eletrólito suporte que entra na célula. Na parte inferior fica acoplada uma placa de cobre que faz o contato elétrico com eletrodo de trabalho. O eletrodo de BDD foi utilizado como trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e o Ag/ AgCl como eletrodo de referência.

FIGURA 7: Esquema da célula do tipo “Wall Jet” utilizada no sistema FIA-MPA.



Fonte: Próprio autor.

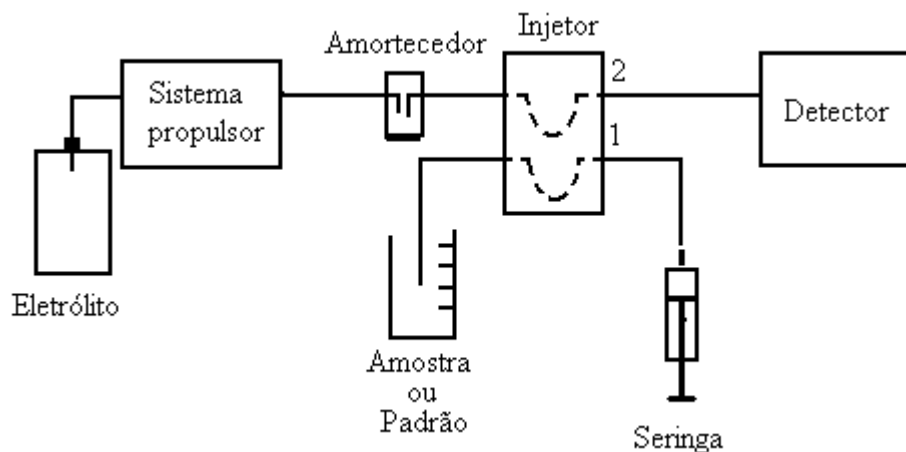
O eletrodo de BDD empregado nas análises foi com nível de dopagem de aproximadamente 8.000 ppm (1,2 mm de espessura) adquirido da empresa NeoCoat SA (La Chaux-de-Fonds, Suíça) suportado sobre uma placa policristalina de silício com área superficial de 1,0 cm². A área de trabalho realmente usada desta placa de BDD foi delimitada em 0,13 cm² por um O-ring de 0,4 cm de diâmetro. O eletrodo de BDD passou por dois tratamentos em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, com o objetivo de avaliar mudanças no comportamento eletroquímico do analíto. O tratamento catódico do BDD foi realizado aplicando primeiramente uma corrente de 0,001 A por 60 s e depois -0,03 A por 360 s. Para o tratamento anódico houve apenas uma inversão na ordem dessas aplicações.

3.1.2 Sistema FIA

O sistema FIA utilizado é composto basicamente por um sistema propulsor, um injetor de amostras, um detector eletroquímico e tubos de polietileno em linha única (Figura 8). O sistema propulsor empregado foi uma bomba peristáltica (Gilson - Miniplus evolution), que proporciona o fluxo controlado do eletrólito em uma linha única até chegar ao detector. O sistema contava ainda com um amortecedor de pulso (construído no próprio laboratório) para evitar ruídos na linha de base da detecção eletroquímica devido à pulsação dos roletes da bomba peristáltica. O injetor é uma estrutura de acrílico que possui uma alavanca que permite que a alça de amostragem assuma as posições 1 ou 2, permitindo ou não que solução do eletrólito em fluxo leve o conteúdo da alça para o detector. A alça de amostragem que é

representada por tracejado na Figura 8 é preenchida com a solução padrão ou amostra do analito por meio de uma seringa.

FIGURA 8: Esquema do sistema FIA.



Fonte: Próprio autor.

3.2 Reagentes e soluções

As soluções foram todas preparadas com água deionizada apresentando resistividade maior ou igual a 18,2 MΩ, obtida a partir do sistema de purificação de ELGA, modelo Di-MKZ. O padrão de CO obtido da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) foi utilizada no preparo da solução de estoque de trabalho, preparada com água a uma concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. A investigação da detecção eletroquímica da CO foi avaliada em tampão Britton Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs (2 a 12). Os demais testes para avaliar o comportamento da CO envolvendo as voltametrias, bem como os testes para otimizar os parâmetros FIA-MPA, foram realizados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,00. Para os tratamentos da superfície do eletrodo de BDD foi empregada uma solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2.1 Coleta e preparo da Saliva

A saliva utilizada nos testes foi obtida de um voluntário não fumante, sendo a coleta realizada pelo uso do Salivette® (Figura 9A), que são kits comercialmente disponíveis próprios para esse fim. O Salivette® possui um rolo cilíndrico de algodão que mede

aproximadamente 1 cm de espessura e 3,5 cm de comprimento, envolto por um tubo de plástico que pode ser levado à centrifuga (Figura 9B).

FIGURA 9: Salivette® (A) Tubo que contém as demais estruturas do kit. (B) Rolo cilíndrico de algodão que mede aproximadamente 1 cm de espessura e 3,5 cm de comprimento utilizado para coleta de saliva.



Fonte: Próprio autor.

Durante a coleta o algodão permaneceu sob a língua por 10 min, para que a saliva fosse absorvida, sendo depois centrifugado à 2800 rpm por 15 min para recuperação da amostra. A coleta pelo Salivette® é simples de ser realizada e higiênica permitindo a obtenção de até 2 ml de saliva. A coleta da amostra foi realizada em no máximo 1,0 h antes das análises pelos métodos eletroquímicos, de acordo com as recomendações indicadas para a coleta de saliva que inclui: ausência de alimentação por um período de no mínimo 30 min antes da coleta; lavar a boca apenas com água imediatamente antes da coleta com bochechos leves (LUMIKARI, L. M. *et al.* 1995).

3.2.2 Estudo do comportamento eletroquímico

Os estudos de VC foram realizados com soluções padrão de CO preparadas a partir de uma solução estoque a uma concentração de 1,0 mmol L⁻¹. A faixa de trabalho avaliada foi de -1,5 a 2,2 V vs. Ag/ AgCl sobre eletrodo de BDD com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Os estudos de VOQ foram realizados para investigar o número de elétrons envolvidos na oxidação da CO com varredura de 1,0 V a 2,2 V e amplitude de 0,03 V e frequência de 25 Hz com duas soluções de CO nas concentrações de 0,5 e 0,75 mmol L⁻¹.

3.2.3 Otimização dos parâmetros FIA-MPA

Os parâmetros envolvendo a detecção FIA-MPA foram otimizados para se obter uma maior sensibilidade e seletividade na determinação do analito. Todas as análises foram feitas com injeção da amostra em triplicata. Quanto à detecção MPA foram avaliados os pulsos de potenciais aplicados e o tempo de aplicação. Os pulsos de potencial inicialmente estudados foram o de oxidação da CO e o de redução para detectar o produto gerado pela oxidação, além de mais um pulso de potencial para limpeza da superfície do eletrodo de trabalho. Posteriormente outros potenciais foram adicionados e otimizados com o objetivo de diminuir a interferência dos componentes da saliva neste tipo de amostra. Em relação aos parâmetros avaliados no sistema em FIA, foram otimizados a vazão e o volume de amostragem. Todos os parâmetros foram avaliados com uma solução padrão de CO a 0,1 mmol L⁻¹.

3.2.4 Determinação dos pulsos de potenciais e seus respectivos tempos de aplicação para determinação da CO

Inicialmente foram testados os potenciais anódicos com base no estudo de VC da CO que apresentou um processo de oxidação, cujo produto deste processo apresentou uma redução no eletrodo de BDD. Para determinar o potencial anódico com melhores resultados, foram injetados CO em triplicata e o sinal de corrente foi observado. Os potenciais testados foram 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,5; 1,6; 1,8 e 1,9 V, com tempo de aplicação fixado em 100 ms. Devido à dependência do processo catódico em relação ao anódico, um pulso de potencial foi fixado em +1,8 V e os demais pulsos de potenciais de redução foram variados em -0,8; -1,0; -1,1; -1,2 e -1,3 V; com o tempo de aplicação de 30 ms. Os pulsos de potenciais foram determinados com alça de amostragem e vazão de 150 µL e 2 mL min⁻¹, respectivamente. Posteriormente foram avaliados os tempos de aplicação do potencial de oxidação que foi variado de 100 a 800 ms. O tempo de aplicação para a redução do produto gerado pela oxidação da CO foi mantido no menor tempo possível.

3.2.5 Determinação da alça de amostragem e vazão do sistema FIA

As especificações de fluxo e alça de amostragem influenciam diretamente na sensibilidade do método e precisam ser investigados. Estes estudos foram feitos com injeção

da CO na concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em triplicata. A vazão foi variada de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,0; 3,5 e $4,0 \text{ mL min}^{-1}$. Quanto à alça de amostragem foram testados os volumes de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e $400 \text{ }\mu\text{L}$. A escolha da melhor condição nesse caso foi determinada de acordo com um sinal de corrente máximo observado para o processo catódico.

3.2.6 Escolha do pulso de potencial e tempo de aplicação para limpeza do eletrodo de BDD

Com o objetivo de melhorar a reprodutibilidade e conseqüentemente a eficiência do método, um pulso de potencial para limpeza da superfície do BDD foi avaliado. Para determinar o melhor pulso de potencial foi avaliado o desvio padrão relativo (DPR) referente a 10 injeções de CO $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Os potenciais testados foram -1,25; -1,30; -1,35; -1,40; -1,45 e -1,50 V. O pulso de potencial com os melhores resultados foi fixado em -1,45 V e uma variação do tempo de sua aplicação foi avaliado em 100; 200; 300; 400 e 500 ms.

3.2.7 Estudo para avaliar interferência da saliva

O estudo da interferência da composição da saliva na determinação de CO foi realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por injeções em duplicata no sistema FIA-MPA de três soluções diferentes. Inicialmente foi avaliado o sinal de corrente obtido por uma solução padrão de CO $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, depois por uma saliva (diluída em 10 vezes) de um paciente com e sem adição de CO $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

Após verificação da interferência da amostra no sinal de detecção da CO, uma segunda etapa foi adicionada para tentativa de eliminação dos interferentes. Nesse caso, todas as soluções foram preparadas da mesma maneira, havendo, porém um tratamento da saliva antes do preparo, adicionando 0,5 ml de NaOH a um volume de 5 ml de saliva, que depois foi centrifugando à 2800 rpm por 5 min, como objetivo de precipitar possíveis metais que pudessem estar interferindo nas análises.

Uma terceira etapa deste estudo envolveu a adição de mais um pulso de potencial em -1,0 V antes do pulso de potencial aplicado para o processo catódico e detecção da CO, com intuito de reduzir anteriormente todos os interferentes no potencial detector. Desta forma, foi avaliado o tempo de aplicação (0,3; 0,5; 0,7 e 0,9 s) em -1,0 V necessário para eliminar tais interferentes. Foi testado também o aumento no tempo de aplicação do pulso de potencial

catódico (-1,2 V), com o objetivo de eliminar totalmente o sinal de corrente fornecido pelos interferentes presentes na saliva. Os tempos testados foram 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 0,6 s.

3.2.8 Ensaios de repetibilidade e determinação da faixa linear de trabalho

Depois de otimizados todos os parâmetros de forma a eliminar o sinal de interferência da saliva, foi realizado o teste de repetibilidade com 10 injeções consecutivas de CO na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo avaliado o Desvio Padrão Relativo (DPR). A faixa linear de trabalho foi determinada e sua respectiva regressão linear foi obtida por meio do FIAgrama das injeções feitas em triplicata em concentrações de CO 0,50 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.2.9 Estudos dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e ensaio de adição- padrão

O cálculo de LD e LQ foram feitos com base no FIAgrama obtido das injeções em triplicata da CO nas concentrações de 0,50; 5,0; 10; 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e pela sua regressão linear. O LD foi estimado a partir do DPR do sinal de 10 sinais aleatórios do ruído da linha de base do FIAgrama, multiplicado esse valor por 3 e dividido pela inclinação da regressão linear obtida da curva analítica. A única diferença para calcular o LQ foi que o valor do DPR foi multiplicado por 10. O estudo de adição-recuperação nas amostras foram realizados utilizando o método de adição-recuperação com o objetivo avaliar a interferência da matriz, bem como a exatidão do método.

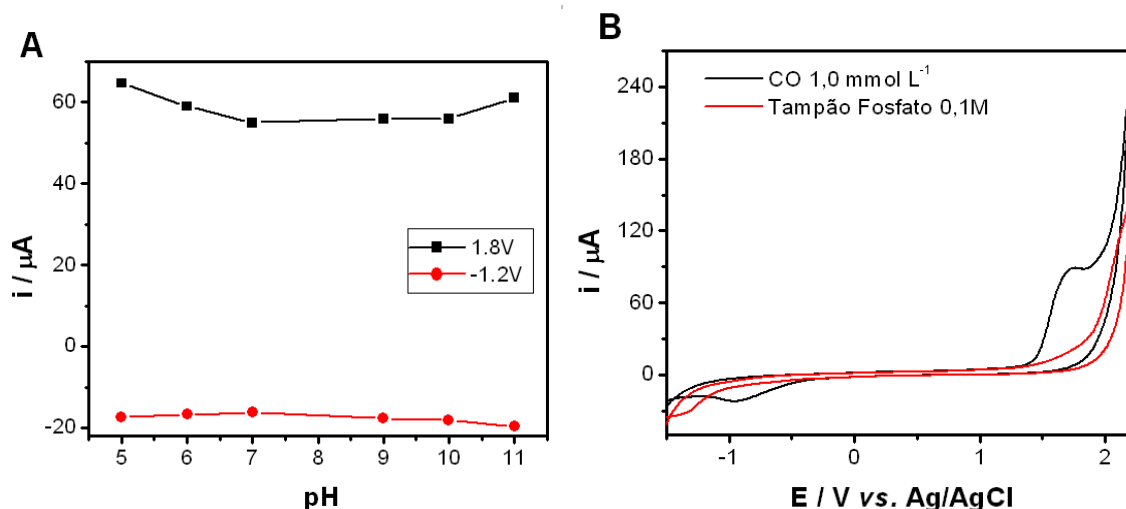
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões deste trabalho serão apresentados em duas partes. A primeira delas será voltada para apresentação e discussão dos resultados que envolvem a caracterização eletroquímica da CO pelo uso das técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de varredura Linear (VVL) e voltametria de onda quadrada (VOQ). Na segunda parte serão discutidos os parâmetros da técnica FIA-MPA que foram otimizados e permitiram a determinação da CO em saliva por este método.

4.1 Caracterização eletroquímica da CO

O comportamento da CO foi inicialmente avaliado em tampão Britton Robinson por VC no eletrodo de BDD, sendo testada a faixa do eletrodo de trabalho entre -1,5 V a 2,2 V. A faixa de pH estudado foi de 2,00 à 12,00 e, apesar da dependência de H^+ nos processos redox observados (Figura 12 A), não houve grandes deslocamentos de potenciais para os processos redox e nem uma diferença significativa entre o sinal de corrente de pico catódico e anódico, como pode ser visto em detalhe na Figura 10B. Sendo assim o pH escolhido para otimizar todos os demais parâmetros foi o 7,00, uma vez que, este é o pH aproximado da saliva. Nessas condições a CO apresentou dois processos no eletrodo de BDD (Figura 10 A), sendo um anódico em +1,8 V e um catódico em -1,2 V, os quais são irreversíveis. Cabe destacar que, o eletrodo de BDD por apresentar uma ampla faixa de trabalho, permitiu que a CO pudesse ser determinada mesmo apresentando processos de oxidação e redução em potenciais extremos.

FIGURA 10: (A) Variação da corrente de pico obtida por VC em função da variação do pH para os potenciais aplicados -1,2 V e 1,8 V. (B) Voltamogramas cíclicos somente tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,00 (-), com adição da CO 1,0 mmol L⁻¹.

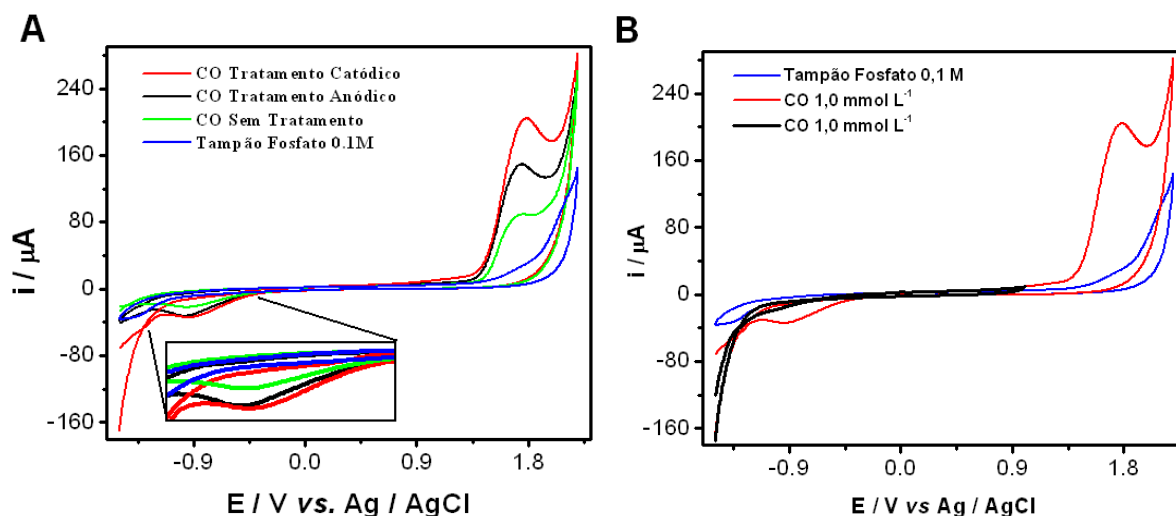


Fonte: Próprio autor.

Os tratamentos catódico e anódico da superfície do eletrodo foram testados, como pode ser observado na Figura 11 A, e ambos implicaram numa melhora do sinal de corrente observado para os processos redox envolvendo a CO. Os melhores resultados foram obtidos com pré-tratamento catódico em função do aumento significativo da corrente observada no processo de oxidação, sendo o escolhido para ser realizado antes de cada análise neste trabalho.

A dependência existente entre o processo de redução em relação à oxidação é representado na Figura 11 B. Para mostrar essa dependência foram realizadas duas varreduras de potencial como antes na faixa de -1,5 V a 2,2 V, que são apresentados voltamogramas em azul e vermelho para o eletrólito suporte sem e com adição de CO, respectivamente. Posteriormente, outra faixa de varredura de potencial foi avaliada onde o processo de oxidação da CO não era iniciado, ou seja, apenas entre potenciais -1,5 V até 1,0 V. Nestas condições, não houve nenhum processo de redução observado no VC (em preto) da Figura 11B. Este estudo evidencia que nas condições desta análise a redução acontece apenas quando o produto da oxidação é gerado em +1,8 V.

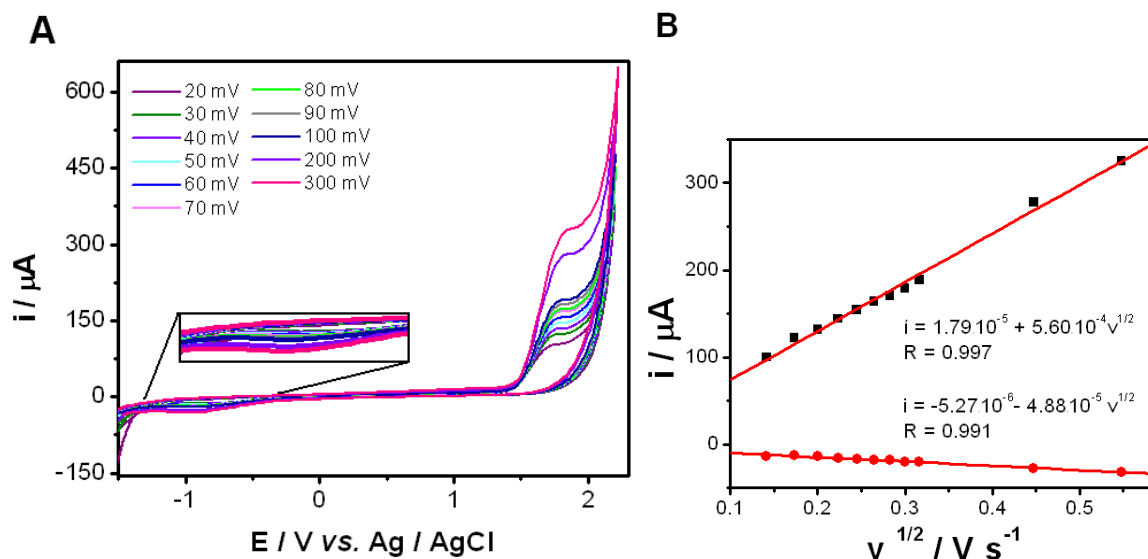
FIGURA 11: (A) Voltamogramas cíclicos do eletrólito tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (-); com CO $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sob Tratamento catódico (-); com Tratamento anódico (-) e sem tratamento (-). Em detalhe o processo de redução da CO oxidada. (B) Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (-); com CO $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com varredura de potencial de $-1,5 \text{ V}$ a $2,2 \text{ V}$ (-) e varredura de potencial de $-1,5$ a $1,0 \text{ V}$ (-).



Fonte: Próprio autor.

Os estudos voltamétricos da CO variando a velocidade de varredura podem ser vistos na Figura 12. Os valores das correntes de pico anódico e catódico foram plotados em função da raiz quadrada das velocidades de varredura aplicadas, o gráfico é apresentado na Figura 12B. Foi possível observar um aumento na intensidade das correntes anódica e catódica em função do aumento da raiz quadrada da velocidade, havendo uma relação linear entre estas variáveis. Nessas condições apresentadas verificamos que o processo de transporte de massas para a CO é preferencialmente difusional sobre o eletrodo de BBD.

FIGURA 12: (A) Voltamogramas para CO 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. (B) Gráfico da corrente da oxidação e da redução em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.



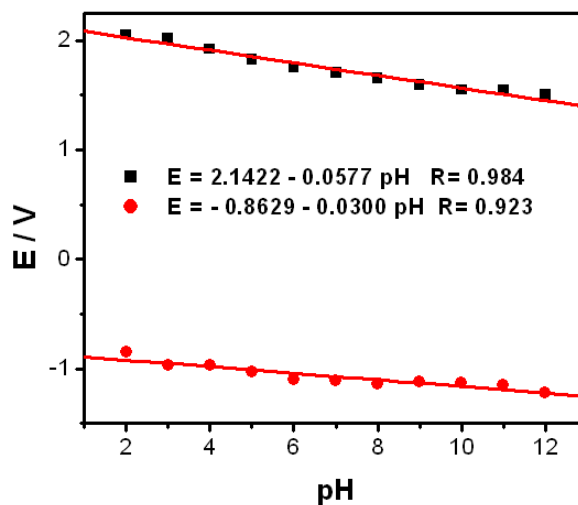
Fonte: Próprio autor.

Dando continuidade a investigação do comportamento eletroquímico da CO, foi avaliado por meio da VC a influência do pH sobre o potencial de pico anódico e catódico observados para este composto. A faixa de pH avaliada neste estudo foi de 2 à 12 sendo observado uma relação linear entre os referidos parâmetros (Figura 13). O coeficiente angular do gráfico obtido foi 0,0577 para a oxidação, valor este que está muito próximo ao valor esperado para um sistema que obedece a equação de Nernst de 0,0592 (conforme mostrada abaixo), indicando que o número de prótons envolvidos na reação eletroquímica é igual ao número de elétrons. Cabe ressaltar que essa relação usando a equação de Nernst é permitida totalmente apenas para processos reversíveis, porém uma aproximação pode ser feita visto que observamos o produto gerado da CO pelo VC.

EQUAÇÃO 1:

$$E = E^0 \frac{0,0592}{n} \log Q$$

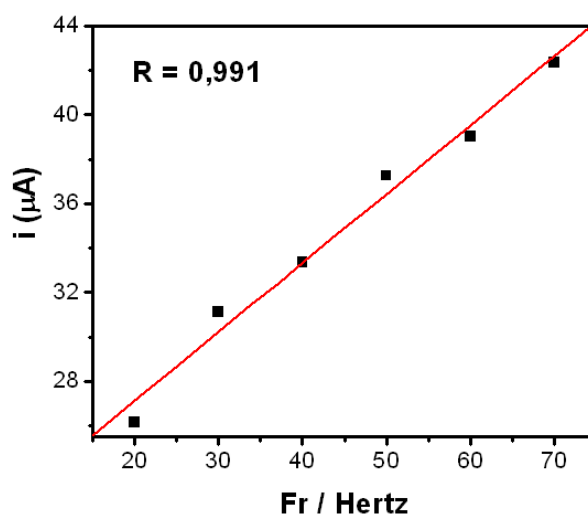
FIGURA 13: Potencial de pico catódico e anódico obtidos dos voltamogramas da CO 1,0 mmol L⁻¹ em tampão Britton Robson em função de diferentes pHs.



Fonte: Próprio autor.

O processo de oxidação da CO é claramente irreversível pela diferença de potencial existente entre os picos. No entanto, apenas para confirmar foi obtida uma relação linear entre a corrente de pico anódico da CO em função da variação da frequência pela VOQ, como mostra na Figura 14, indicando que processo é totalmente irreversível (DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., 2003).

FIGURA 14: Relação entre a variação da frequência de 20 a 70 Hertz pela corrente de pico anódico, obtido por VOQ. CO 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. Incremento de potencial de 0,02 V e amplitude de 0,5 V.



Fonte: Próprio autor.

O número de elétrons (n) envolvidos na reação de oxidação da CO foi calculado pela equação 2 apresentada abaixo onde I é a corrente; $I_{L,a}$ é a corrente limite; α o coeficiente de transferência de carga; E o potencial; F a constante de Faraday; R a constante universal dos gases, $E_{1/2}^{irr}$ é o potencial de meia onda e varia com o transporte de massa para a superfície do eletrodo (BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M., 1993).

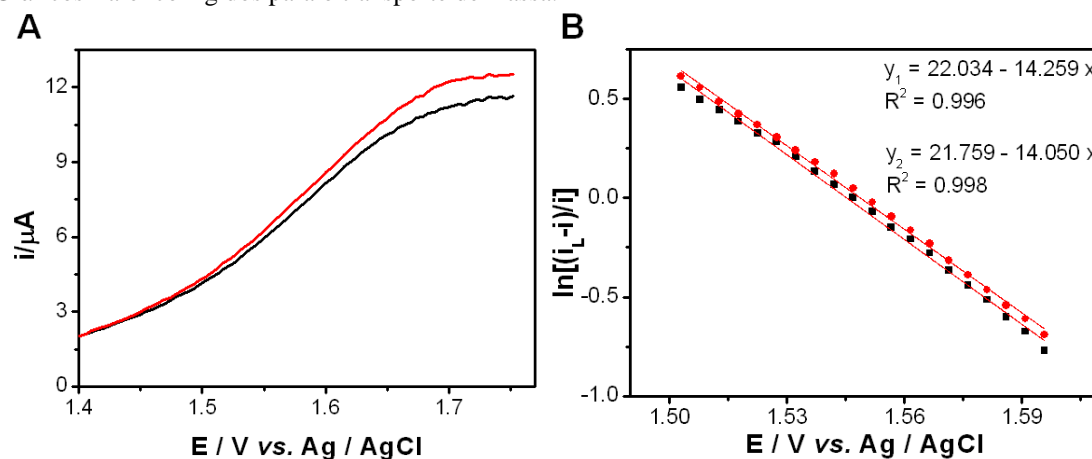
EQUAÇÃO 2:

$$\ln\left(\frac{I_{L,a} - I}{I}\right) = \frac{\alpha_a n F}{RT} E_{1/2}^{irr} - \frac{\alpha_a n F}{RT} E$$

$$\alpha = \frac{1,7RT}{WF}$$

Para obter os valores de E , e I , uma VVL foi realizada em condições hidrodinâmicas para duas concentrações diferentes de cotinina 0,5 e 0,75 mmol L⁻¹. A solução foi incessantemente agitada com o auxílio de um motor e os perfis de corrente podem ser vistos na Figura 15A. Os gráficos Tafel corrigidos para o transporte de massa são apresentados na Figura 15B.

FIGURA 15: (A) Voltamograma hidrodinâmico da CO nas concentrações de 0,5(-) e 0,75(-) mmol L⁻¹. (B) Gráficos Tafel corrigidos para o transporte de massa.

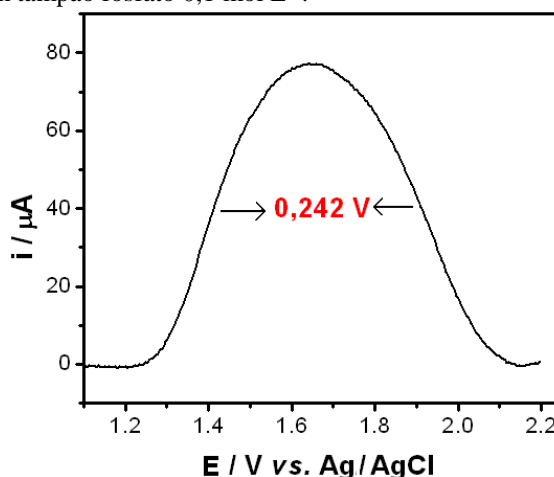


Fonte: Próprio autor.

No entanto, para utilizar a equação (2) para a estimativa de (n) é necessário conhecer o coeficiente de transferência de carga (α). Para as reações irreversíveis o parâmetro α pode ser determinado experimentalmente, obtendo-se o W que corresponde à largura da meia-altura do voltamograma de onda quadrada, realizado em baixas amplitudes

(FATOUROS, N.; KRULIC, D., 1998). Esse estudo foi realizado com solução de CO 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ é mostrado na Figura 16.

FIGURA 16: Voltamograma de onda quadrada, com varredura de 1,0 a 2,2 V, amplitude de 0,03 V e frequência de 25 Hertz. CO 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹.



Fonte: Próprio autor.

Para a oxidação de CO no eletrodo de BDD o valor de α encontrado foi de 0,18, o que sugere pobre simetria da barreira de energia relativa à reação eletroquímica envolvendo a oxidação da CO. A partir dos cálculos realizados, o número de elétrons definido para a oxidação de CO foi 2, e como também sugerido pelo estudo da Figura 13, o número de prótons é igual ao de elétrons, sendo proposto a oxidação da CO como se segue:

EQUAÇÃO 3: Oxidação proposta para CO



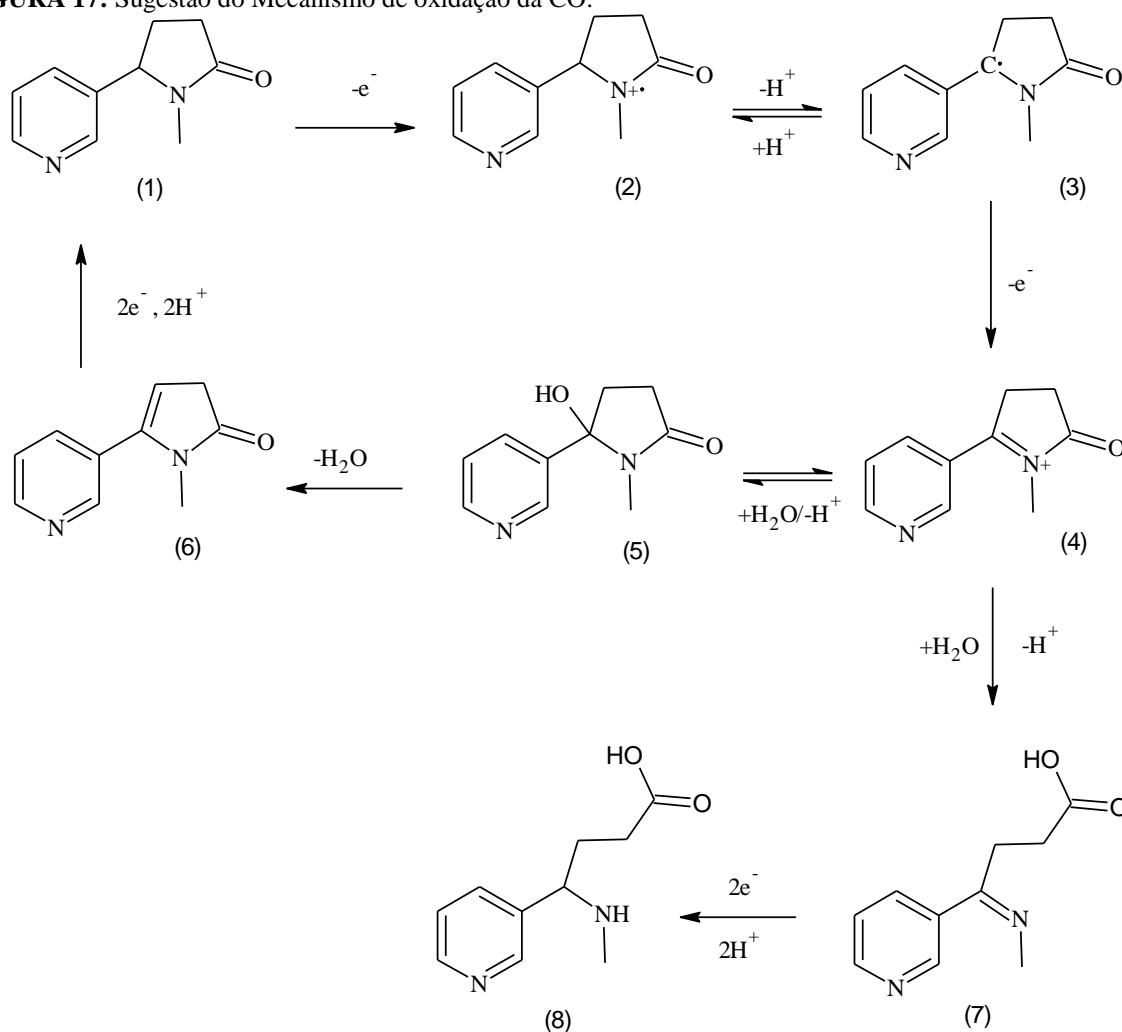
Cabe destacar que, usando esse método para calcular o número de elétrons não é necessário conhecer o coeficiente de difusão da CO, que não foi encontrado na literatura até a realização deste trabalho. Sendo assim, partindo desses cálculos o coeficiente de difusão (D) também foi calculado utilizando a Equação 4, onde n é o número de elétrons, α é o coeficiente de transferência de carga, n é o número de elétrons implicados na etapa determinante da velocidade da reação, A é a área do eletrodo, D é o coeficiente de difusão, C_∞ é a concentração da espécie eletroativa e v é a taxa de varredura (BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M., 2003).

EQUAÇÃO 4:

$$i_p = 2.99 \times 10^5 n(\alpha n^*)^{1/2} A D^{1/2} C_{\infty} \nu^{1/2} \quad (3)$$

O parâmetro (αn) foi calculado considerando o fato de que a mudança na E_p para cada aumento de 10 vezes na ν é 1.15RTF. O valor obtido para (αn) foi de 0,34. Usando o coeficiente angular observado no gráfico i_p vs. $\nu^{1/2}$ o valor de D obtido foi $1,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Para confirmar se a forma de calcular que usamos estava correta, realizamos os mesmos cálculos para um composto eletroativo de comportamento eletroquímico irreversível, o qual já foi relatado na literatura o seu número de elétrons, como por exemplo, para o ácido ascórbico. Os cálculos foram realizados e o mesmo valor de dois elétrons foi encontrado conforme previamente relatado. Um detalhamento desses cálculos realizados está sendo descrito pelo grupo de pesquisa para publicação na literatura, visto que este problema é recorrente para detecção de novos compostos eletroativos, quando não se pode considerar o coeficiente de transferência de carga (α) = 0,5. Cabe destacar que, quando o α pode ser considerado como 0,5, de Souza e colaboradores os cálculos para descobrir o número de elétrons é muito mais fácil usando apenas a voltametria de onda quadrada (DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., 2003). Outra maneira para calcular o número de elétrons de processos irreversíveis foi relatada por Lourenção e colaboradores, onde foi realizado o cálculo por meio da quantidade de carga consumida durante uma eletrólise. No entanto, este método pode levar a erros caso a eletrólise e/ou a determinação do número de mols consumidos do composto eletroativo não sejam feita de forma completamente eficiente (LOURENÇÃO, B. C., 2014).

Como o presente estudo é o primeiro relatado para oxidação da CO por métodos eletroanalíticos, o presente trabalho também buscou propor uma sugestão de mecanismo desta molécula baseando-se nos resultados obtidos pela detecção eletroquímica. Assim sendo, a proposta do mecanismo é apresentada na Figura 17:

FIGURA 17: Sugestão do Mecanismo de oxidação da CO.

Fonte: Próprio autor.

O mecanismo de oxidação para CO (I) proposto nesta Figura 16 foi baseado em reações de amidas e carbonilas em meio aquoso e, de acordo com essas condições, tem-se apenas duas rotas possíveis de (1) para (5) ou de (1) para (7). Ambos os processos de oxidação em meio aquoso levarão ao íon N-acílio (4), entretanto, a partir daí podem ocorrer duas reações de hidratação distintas (ROSS, S. D.; FINKELSTEIN, M.; PETERSEN, R. C., 1966; O'DONNELL, J. F.; MANN, C. K., 1967; CARRENO, M. C.; RIBAGORDA, M., 2000). A primeira seria o ataque ao carbono α -amino, que leva ao produto amino álcool (5) e, na segunda, o ataque ocorre a carbonila, levando ao ácido (7). Ambos os processos de oxidação envolvem a perda de $2e^-$ e $2H^+$. Esta sugestão corrobora com os resultados obtidos em relação ao número de elétrons e prótons calculados para CO. Além disso, em termos reacionais, o ataque a carbonila é muito mais favorecida em meio aquoso do que ataque na imina sendo assim, o produto (7) deve ser o prioritário.

Para o processo de redução que foi também observado pela VC sobre o BDD, duas sugestões seriam possíveis: a do produto (5) retorna a CO (1), porém passando por um intermediário (6) diferente das estruturas envolvidas no processo de oxidação. Nesse caso esse aplicarmos a equação de Nernst para um processo reversível, esta hipótese do produto (5) estaria descartada, pois se considerarmos que o número de prótons em relação ao número de elétrons é o dobro, conforme mostrado na Figura 13, onde o ângulo da curva de E_p de redução vs. pH foi próximo de 0,0296 V. Por outro lado, a redução de (7) ocorre no grupo imino e leva ao produto (8), que certamente teria um potencial muito diferente, como num processo irreversível, comprovando a formação de um novo produto. Neste caso, a sugestão da redução de (7) para (8) envolve o ganho de $2e^-$ e $2H^+$ não poderia ser confirmada pela equação de Nernst para relação de prótons e elétrons observada.

4.2 Determinação da CO por FIA-MPA

Após o estudo do comportamento eletroquímico da CO no eletrodo de BDD nas condições apresentadas, foi investigada a detecção e quantificação deste analíto. No entanto, antes de iniciar a apresentação e discussão desses resultados, vale lembrar que, na literatura estudos para o comportamento da nicotina sobre o eletrodo de BDD por meio de VOQ com o mesmo eletrodo de referência, mostrou que esse composto apresenta apenas um pico de oxidação em +1,3 V e nenhum processo de redução (SUFFREDINI, H. B. *et al.* 2005). Como já foi discutido, de 70 a 80% da nicotina absorvida pelo organismo é metabolizada em CO e embora a nicotina seja excretada inalterada pelo organismo em quantidades mínimas na saliva, a princípio sua presença seria um interferente para quantificar a CO pelo processo de oxidação utilizando técnicas amperométricas, mas não afetaria a detecção da CO pelo processo de redução.

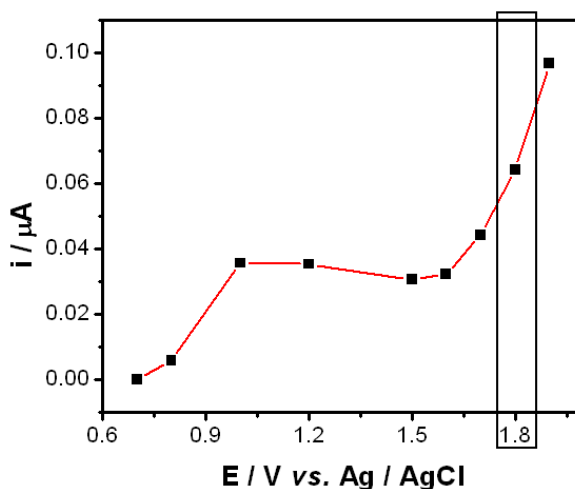
Dessa forma, os parâmetros para a detecção FIA-MPA foram todos otimizados com o objetivo de se obter maiores sinais de corrente para as reações envolvendo o processo de redução da CO, buscando uma maior sensibilidade e seletividade do método. Nesse sentido, o primeiro passo foi otimizar o potencial relacionado a oxidação da CO, o qual gera o produto que será utilizado para detectar e quantificar a CO pelo processo de redução no eletrodo de BDD.

4.2.1 Otimização para oxidação da CO

Considerando que a saliva possui vários compostos que sofrem oxidação e que podem interferir na análise, além da possível interferência da nicotina, os parâmetros foram otimizados com base na aplicação de dois pulsos de potenciais principais: o primeiro para oxidar a CO (pulso de potencial gerador - E_G) e o segundo para determinar o produto gerado pela oxidação (pulso de potencial coletor - E_C). Os tempos de aplicação dos pulsos também foram otimizados de acordo com a finalidade de cada um deles.

Para a oxidação da CO foram testados oito pulsos de potenciais sendo eles: 0,7; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8 e 1,9 V (Figura 18). O tempo de aplicação dos pulsos de potenciais foi fixado em 100ms, a vazão em $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e a alça de amostragem de $150 \mu\text{L}$. Nessas condições, como pode ser visto na Figura 18, o processo de oxidação da CO iniciou-se em torno de +0,8 V no sistema de detecção havendo um aumento até o pulso de potencial de +1,9 V, o qual gerou um sinal de corrente maior para o processo de oxidação entre os valores de potencial que foram avaliados. Pulsos de potencial maiores que 1,9 V não foram avaliados devido à alta corrente capacitiva gerada no sistema de detecção MPA nesses valores. Observa-se também que houve um patamar quase constante de corrente entre o pulso de potencial de 1,0 a 1,6 V, o que provavelmente pode estar relacionada à transferência de carga do primeiro para um segundo elétron no processo de oxidação da CO. O pulso de potencial escolhido foi o de +1,8 V por conferir uma melhor sensibilidade na geração do produto que será detectado em relação aos pulsos de potencial mais baixos, além de uma menor corrente capacitiva gerada em relação aos pulsos de potencial mais altos.

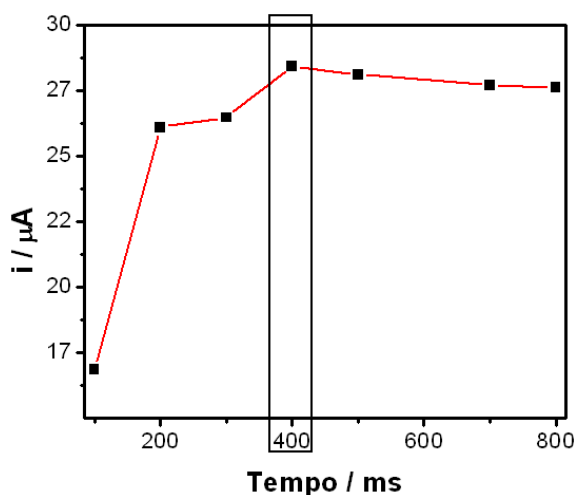
FIGURA 18: Gráfico obtido pela injeção em triplicata de CO 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, detectada pelo método MPA em FIA sobre o eletrodo de DDB. Os pulsos de potenciais aplicados variou de 0,8 a 1,9 V, sendo todos com duração de 100 ms. Vazão de 2,0 mL min⁻¹ e alça de amostragem de 150 µL.



Fonte: Próprio autor.

Para escolher o tempo do pulso o potencial +1,8 V foi variando o tempo de aplicação de 100 a 800 ms e avaliado o sinal de corrente obtidos nessas condições. O gráfico das correntes obtidas pela E_G para cada tempo é mostrado na Figura 19. O tempo de 400 ms foi escolhido por apresentar melhor resultado de sensibilidade de corrente.

FIGURA 19: Sinal da corrente de pico de oxidação da CO em função da variação do tempo de aplicação do E_G. O E_G foi fixado em +1,8 V e o tempo de aplicação variado em 100 a 800 ms. Vazão de 2,0 mL min⁻¹ e alça de 150 µL.



Fonte: Próprio autor.

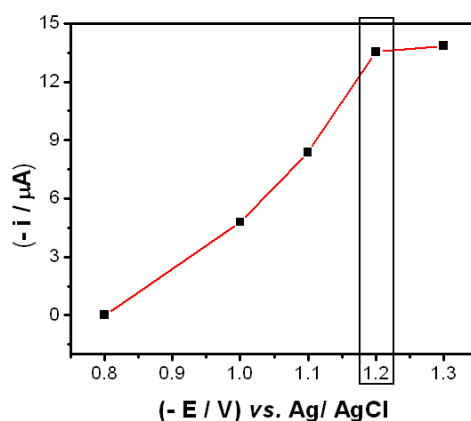
Como esperado a Figura 18 mostra que quanto maior o tempo de aplicação para o pulso do E_G mais espécies de CO oxidadas na superfície do BDD. Esse aumento ocorre até certo limite, em que o tempo aplicado é grande o suficiente para que o composto oxidado seja

retirado da superfície do eletrodo pelo fluxo contínuo de eletrólito, antes que possa ser detectado. Esse fato ocorre a partir de 400 ms, o qual é possível observar uma leve diminuição do sinal obtido para oxidação da CO.

4.2.2 Otimização para redução da CO

Como observado no estudo do comportamento eletroquímico, a redução da CO é dependente da oxidação. Sendo assim, o pulso de potencial para oxidação foi fixado em +1,8 V por 400 ms e os seguintes E_C foram testados: -0,8; -1,0; -1,1; -1,2 e -1,3 V. O tempo de aplicação de 30 ms para todos os E_C foram fixados, uma vez que, quando se trata de determinar um composto que é gerado durante uma análise, tempos menores pode gerar um maior sinal de corrente faradáica, além de possibilitar a determinação do composto antes que este seja retirado da superfície do eletrodo (DOS SANTOS, W. T. P. *et al.* 2011). Os E_C em -1,2 V e -1,3 V apresentaram os maiores resultados para a corrente de pico catódico, como pode ser visto na Figura 20, sendo justificada a escolha do pulso de potencial -1,2 V por ele apresentar maior seletividade para detecção da CO.

FIGURA 20: Gráficos obtidos pela média das correntes obtidas por FIA-MPA sobre BDD de soluções padrão de CO 0,5 mmol L⁻¹ injetada em triplicata. E_G de 1,8 V por 400 ms e E_C variando de -0,8 a -1,3 V todos com duração de 30ms. Vazão de 2,0 mL min⁻¹ e alça de amostragem de 150 µL.



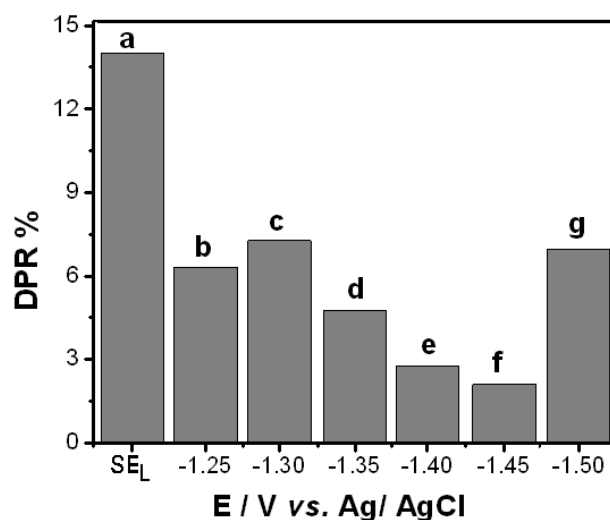
Fonte: Próprio autor.

4.2.3 Determinação do pulso de potencial e tempo de aplicação para limpeza do eletrodo

A necessidade de pulsos de potenciais para a limpeza (E_L) da superfície do eletrodo de BDD foi avaliada. O E_L tem o objetivo de eliminar a interferência de uma possível

adsorção do produto de oxidação da CO na superfície do eletrodo. Essa adsorção poderia provocar a contaminação ou passivação da superfície do eletrodo, comprometendo a reprodutibilidade do método. A escolha foi baseada na melhor repetibilidade obtida pelo desvio padrão relativo (DPR) de 10 injeções consecutivas de CO na concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ sem e com aplicação de E_L para vários pulsos de potencial. Apenas o sinal obtido para o processo catódico foi analisado. Os E_L testados foram -1,25; -1,30; -1,35; -1,40; -1,45 e -1,50 V e sem nenhum E_L (Figura 21). Cabe ressaltar que, todos os valores investigados são maiores que o E_C escolhido (-1,2 V) na tentativa de retirar qualquer produto de oxidação da CO que ainda esteja na superfície do BDD.

FIGURA 21: DPRs de 10 injeções consecutivas de CO $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em função da corrente gerada em -1,2 V/ 30 ms com os seguintes E_L / 100ms: (a) Sem E_L (SE_L); (b) -1,25; (c) -1,30; (d) -1,35; (e) -1,40; (f) -1,45 e (g) -1,50 V. Vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e alça de amostragem de $150 \text{ } \mu\text{L}$. E_G de 1,8 V por 400 ms.



Fonte: Próprio autor.

Como pode ser observado na Figura 21, claramente há uma necessidade de aplicar o E_L para determinação da CO, pois quando este não foi utilizado o DPR das medidas foi quase 15%. No entanto, com a aplicação de E_L , o DPR apresentou-se menor em todos os casos, sendo que, E_L em -1,45 V apresentou o menor DPR (2,11%). O gráfico da Figura 21 mostrou certa tendência de diminuição do DPR em função do E_L aplicado para valores mais catódicos, com exceção de -1,25 V para -1,30 V que pode ser um erro experimental do estudo. Essa tendência pode ser interpretada como uma adsorção do produto da oxidação da CO sobre o eletrodo de BDD, porém pelo gráfico de corrente vs. raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 12B) o processo de redução deste produto mostrou comportamento difusional. Uma possível explicação seria o produto da redução da CO (Figura 17) está

contaminando e/ou passivando superfície do BDD e, neste caso, o E_L mais catódico estaria auxiliando na reativação do material, como já é feito antes de começar as análises com pré-tratamento catódico deste eletrodo. Para valores maiores que 1,45 V para E_L os DPR foi maior, provavelmente, devido à maior corrente capacitiva gerada no sistema de detecção, que acabou interferindo na repetibilidade dos resultados.

Para determinar o tempo de aplicação do E_L , os pulsos E_G e E_C com seus respectivos tempos de aplicação já otimizados foram fixados, variando apenas o tempo de 100 a 500 ms para E_L . O melhor resultado do DPR para 10 injeções da amostra foi obtido para o tempo aplicação de E_L de 300 ms.

Durante todos os testes descritos, foi aplicado entre o E_G e E_C , pulsos de potencial com o objetivo apenas de atenuar a corrente capacitiva gerada no sistema de detecção MPA, melhorando o sinal e o ruído observado para cada pulso de potencial aplicado. Esses pulsos foram denominados pulsos de amortecimento sendo que, estes não foram otimizados e seu tempo de aplicação foi de apenas 50 ms, já que seu objetivo era apenas minimizar a diferença entre potenciais aplicados. Para sua escolha foi considerado apenas que eles tivessem um potencial intermediário entre o E_G e E_C . Os potenciais para amortecimento não foram monitorados em nenhuma análise. Sendo assim, a sequência de pulsos de potencial utilizados para determinar a CO por MPA foram:

- (1) 1,79 V por 30 ms. Oxidação e monitoramento do sinal da CO.
- (2) 1,8 V por 400 ms. E_G : Oxidação da CO e geração do produto para ser reduzido.
- (3) 1,0 V por 50 ms. Amortecimento.
- (4) 0,1 V por 50 ms. Amortecimento.
- (5) -1,2 V por 30 ms. E_C : Redução do produto gerado em E_G e quantificação indireta da CO em saliva pela corrente obtida.
- (6) -1,45 V por 300 ms. E_L : limpeza e reativação da superfície do eletrodo de BDD.
- (7) 0,1 V por 50 ms. Amortecimento.
- (8) 1,0 V por 50 ms. Amortecimento.

Cabe destacar que, o primeiro pulso de potencial em 1,79 V foi usado para monitorar o sinal da CO, buscando futuramente uma relação entre as razões de correntes obtidas em E_G e E_C para um teste qualitativo do composto neste tipo de amostra. Entretanto, sempre foi observado um sinal de corrente muito alto no E_G quando amostras de saliva foram

injetadas no sistema FIA-MPA, assim sendo o sinal de corrente neste pulso de potencial não será apresentado e nem discutido neste trabalho.

4.2.4 Determinação da vazão e alça de amostragem do sistema FIA

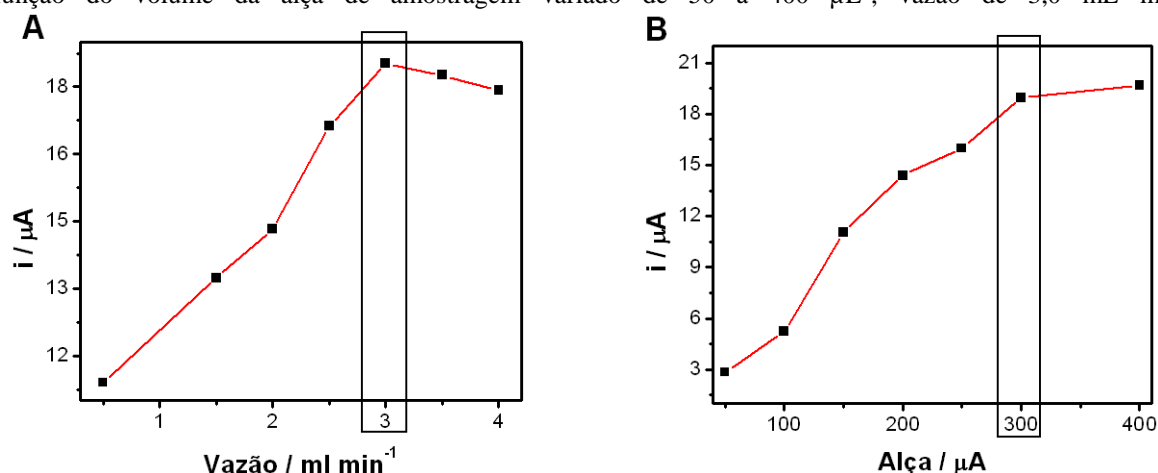
A alça de amostragem e a vazão devem ser otimizadas de forma que o volume ideal de analíto chegue à superfície do eletrodo e permaneça por tempo suficiente para que um sinal máximo de corrente possa ser medido. Esses parâmetros são fundamentais para se obter uma sensibilidade elevada com uma alta frequência analítica, mas sempre preocupando em se obter um sinal transiente para o pico de corrente, que neste caso foram otimizados de maneira que houvesse no mínimo 20 pontos por pico. As análises foram sempre feitas em triplicata e foram considerados apenas os valores de corrente obtidos pelo sinal de redução da CO.

A vazão foi testada de 0,5 à 4,0 mL min⁻¹ (Figura 22) com alça de amostragem fixada em 150 µL, visto que, uma vazão elevada promove um aumento de transporte de massa do analíto para a superfície do eletrodo, o que intensifica o sinal gerado, pela diminuição da espessura da camada de Nersnt. O incremento da vazão pode ser observado com aumento de corrente até um limite, uma vez que a camada de Nersnt diminui apenas até certo ponto. Altas vazões também diminuem a dispersão da amostra durante o percurso analítico no sistema FIA, influenciando uma melhora do sinal.

Para a escolha da alça de amostragem, a vazão foi fixada em 3,0 mL min⁻¹ e os volumes testados foram de 50 a 400 µL (Figura 22B). O tamanho da alça pode influenciar no sinal de pico da corrente de um produto gerado por dois motivos. Um deles é intrínseco do processo de dispersão da amostra ao longo do percurso, que ocorre desde quando ela sai do injetor até atingir o eletrodo. Essa dispersão ocorre em todas as análises realizadas em fluxo e exerce maior influencia quando o caminho percorrido pela amostra até o detector é maior e quando o volume de injeção for pequeno. Essa interferência ocorre até a fase em que o volume injetado é o suficiente para percorrer do caminho até o injetor, sem que o seu centro sofra influencia da dispersão. A partir desse volume o sinal obtido dessa amostra passa a não sofrer variações, mesmo se volumes maiores forem adicionados. Cabe lembrar que, em relação à área do pico, esta sempre é aumentada com tamanho da alça de amostragem, porém, em geral, na detecção eletroquímica usamos o pico da curva de corrente. Outro motivo que alça pode influenciar está na quantidade de espécies geradas pelo E_G, que são maiores à medida que alça aumenta. Em contra partida, volumes muito grandes, podem gerar

problemas relacionados à contaminação ou passivação da superfície do eletrodo, além de reduzir a frequência analítica.

FIGURA 22: Corrente catódica da CO em -1,2 V/ 30ms. E_G 1,8 V/ 400 ms, E_L -1,45 V/ 300 ms (A) Corrente catódica em função da variação da vazão de 0,5 à 4,0 mL min⁻¹ com alça de 150 μ L (B) Corrente catódica em função do volume da alça de amostragem variado de 50 à 400 μ L¹, vazão de 3,0 mL min⁻¹.



Fonte: Próprio autor.

Como pode ser visto na Figura 22, a vazão que apresentou maior corrente de pico foi de 3,0 mL min⁻¹ e esta foi escolhida. A partir desta vazão, há uma diminuição do sinal que pode ser decorrente da saída de espécie gerada da superfície do eletrodo antes de ser detectada pelo sistema. Como mostra na Figura 22 B, o sinal obtido tende a ser mais expressivo quando um volume maior de amostra for analisado, uma vez que, mais espécies chegam à superfície do eletrodo. O volume escolhido foi o de 300 μ L, pois, a partir dele o sinal tende a ser constante e temos uma diminuição da frequência analítica, além da preocupação com contaminação maior do eletrodo em volumes maiores. Para os estudos de otimização discutidos até o momento, um resumo destes parâmetros estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2: Parâmetros otimizados para a detecção de CO por FIA-MPA em tampão fosfato 0,1 M.

Parâmetros	Melhores resultados
E_G	+1,8V / 400 ms
E_C	-1,2V / 30 ms
E_L	-1,45V / 300 ms
Vazão	3,0 mL min ⁻¹
Volume da alça de amostragem	300 μ L

Fonte: Próprio autor.

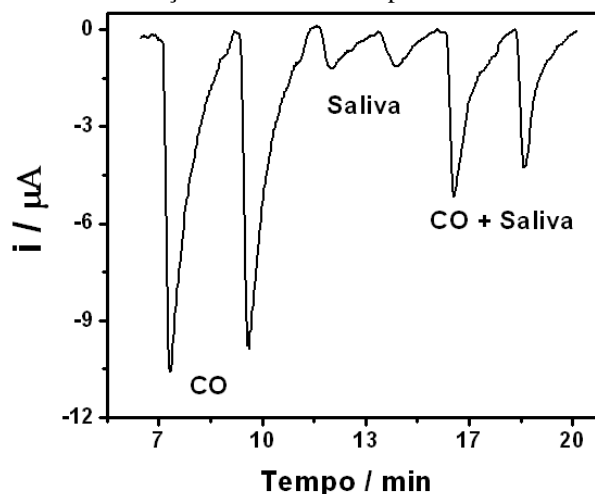
4.2.5 Estudo para avaliar interferência da saliva

A saliva humana é uma amostra que possui vários compostos que podem ser oxidados ou reduzidos nos pulsos de potencial aplicados pelo método proposto para a determinação da CO. Nesse sentido, como há possibilidade de monitorar dois processos da CO pela detecção MPA, o E_C para quantificação deste analito é mais seletivo e dessa forma, um estudo de possíveis interferentes presentes na saliva no E_C foi realizado. Além disso, a saliva foi a amostra de escolha para determinar a CO por ser representativa do grau de exposição de um indivíduo ao tabaco, menos invasiva e com maior facilidade de coleta em relação aos outros fluidos biológicos, como sangue e urina. Dentre os fluidos corporais, a saliva tem sido o material de escolha para determinar os metabólitos da nicotina no organismo por outros trabalhos (DHAR, P., 2004). Em sua grande maioria, esses trabalhos contam com os kits comercialmente disponíveis para amostragem da saliva, os Salivetts®, os quais são fáceis de manipular e permitem uma coleta higiênica e rápida da amostra, proporcionando maior conforto e comodidade ao paciente.

O principal interferente para a determinação da CO pelo processo de oxidação no E_G é o tiocianato, composto que pode ser oxidado e que também é um marcador que caracteriza a exposição ao tabagismo. Como possíveis interferentes para a determinação da CO pela redução no E_C têm-se diversos metais como: Cu, Mg, Pb, Al dentre outros, que podem estar presentes na saliva ou serem adquiridos pelo uso do cigarro, sendo inclusive o alumínio, um metal que pode ser relacionado à exposição ao cigarro (KOH, D. S.; KOH, G. C., 2007; KIM, Y.; KIM, Y. K.; KOH, H., 2010). Embora, nos dois pulsos de potencial há possibilidade de interferência, o potencial escolhido para determinar a CO foi o E_C , pois neste caso pode-se eliminar a interferência dos metais presentes na saliva por um tratamento prévio das amostras com NaOH.

Então, inicialmente, foi avaliado o sinal de corrente do E_C injetando soluções padrão de CO na concentração de $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, depois injetando a saliva diluída 10 vezes coletada com Salivette®, conforme descrito na parte experimental (item 3.2.1), e por último a saliva juntamente com a CO na mesma concentração inicial. Esse estudo foi feito em injeções em duplicata nas condições otimizadas descritas anteriormente, sendo o resultado apresentado na Figura 23.

FIGURA 23: Amperograma obtidos por FIA-MPA com injeções em duplicata das soluções contendo apenas uma solução padrão da CO na concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, apenas saliva diluída 10 vezes e por último a saliva diluída e solução padrão da CO. As condições de análise são apresentadas na Tabela 2

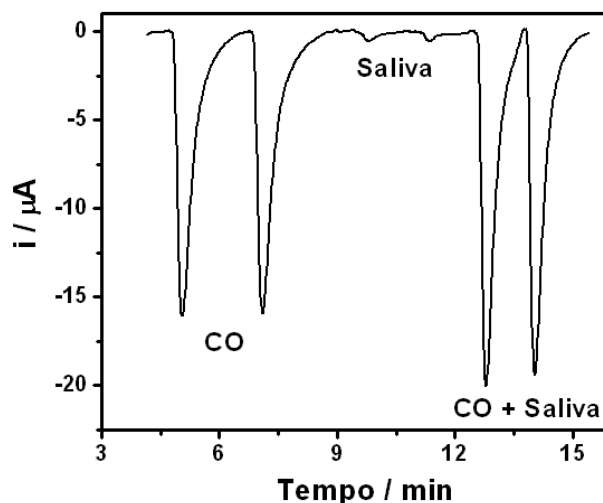


Fonte: Próprio autor.

Como pode ser observado na Figura 23, nas condições otimizadas para o sistema FIA-MPA, a saliva apresentou um sinal de redução no E_c e, além disso, a matriz desta amostra interferiu de maneira significativa no sinal da CO, diminuindo a intensidade do sinal de corrente da CO. A diminuição do sinal pode ter sido provocada por um consumo da CO pela matriz da saliva ou, mais provavelmente, pela adsorção dos íons metálicos reduzidos na superfície do eletrodo de BDD, os quais podem passivar e mudar completamente o comportamento deste material. Sendo assim, as condições otimizadas anteriormente não eram favoráveis para a determinação da CO em saliva utilizando o método proposto. Diante disso, novos estudos foram conduzidos de maneira a eliminar a interferência da saliva na análise de CO.

Considerando que a interferência pudesse ser decorrente da presença de metais na saliva, um tratamento da amostra foi realizado com NaOH com o objetivo de precipitar os metais presentes na amostra. Para este procedimento um volume $0,5 \text{ ml}$ de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionado à 5 ml de saliva coletada, que depois foi centrifugada à 2800 rpm por 5 min . A amostra centrifugada foi diluída em 10 vezes no eletrólito suporte. O pH da solução da amostra foi então verificado e o valor medido foi o mesmo da solução eletrolítica anterior devido à presença do tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O mesmo estudo descrito na Figura 23 foi realizado novamente, porém, desta vez após o tratamento com NaOH descrito (Figura 24).

FIGURA 24: Amperograma obtidos por FIA-MPA com injeções em duplicata das soluções contendo apenas CO na concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, apenas saliva tratada com NaOH diluída 10 vezes e por último os dois juntos. Demais condições são apresentadas na tabela 2.



Fonte: Próprio autor.

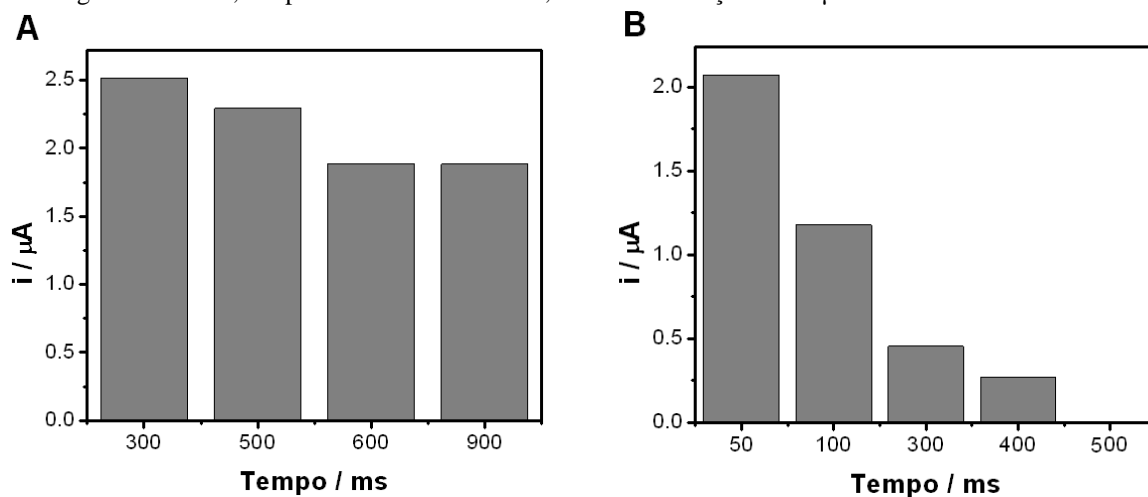
Como pode ser observado na Figura 24, a adição de NaOH no tratamento da amostra diminuiu a magnitude do sinal da CO observado em amostras de saliva, que antes foi na média de $1,20 \mu\text{A}$ e depois de $0,50 \mu\text{A}$, em torno de 60 %. Isso mostra que a adição de NaOH promoveu a precipitação de alguns metais que estavam interferindo na análise. Além disso, observa-se que a razão de sensibilidade entre a detecção da CO e os possíveis interferentes na saliva foi muito maior com adição de NaOH na amostra. Outro ponto importante observado na Figura 24 é que a matriz, aparentemente, não diminuiu o sinal da CO e apenas contribuiu para o aumento do sinal na sua presença. Isso pode estar relacionado ao menor efeito de adsorção dos íons metálicos no eletrodo de BDD nestas condições. No entanto observamos ainda um sinal de interferência no E_C que pode ser devido à presença de níveis traços dos metais ou de outras substâncias. É importante mencionar que, a adição de mais NaOH foi testada e não provocou nenhuma diminuição do sinal de interferência no E_C .

Para eliminar essa interferência ainda existente no E_C , mais um pulso de potencial em $-1,0 \text{ V}$ foi aplicado antes da redução da CO $-1,2 \text{ V}$. Essa etapa teve a finalidade de reduzir os demais interferentes presentes na saliva, antes que o E_C para determinação da CO fosse aplicado. Foi testado também um aumento no tempo de aplicação do E_C , onde a CO ainda pudesse ser detectada sensivelmente e os demais compostos, que estão em pequena quantidade na saliva, seriam reduzidos antes da aquisição do sinal para detecção do analito.

Dessa forma, os pulsos de potenciais de $-1,0 \text{ V}$ e $-1,2 \text{ V}$, tiveram seus tempos de aplicação otimizados, de maneira que a saliva não apresentasse nenhum sinal de redução no E_C . Estes estudos foram baseados na análise do sinal obtido no E_C . Para o pulso de $-1,0 \text{ V}$, os

tempos de 300, 500, 600 e 900 ms foram testados e o sinal de redução da saliva foi determinado como mostra na Figura 25A. Tempos inferiores a 300 ms na duração do pulso de potencial de -1,0 V foram semelhantes na magnitude do sinal obtido no E_C (em -1,2V) e não são mostrados na Figura 25A. O tempo de 600 ms promoveu uma diminuição significativa do sinal da saliva 1,0 V. Para eliminar completamente o sinal da saliva os tempos de 50, 100, 300, 400 e 500 ms foram testados para o E_C , que anteriormente foi otimizado em 30 ms. Como mostra na Figura 25B, o tempo de 500 ms eliminou completamente o sinal da saliva.

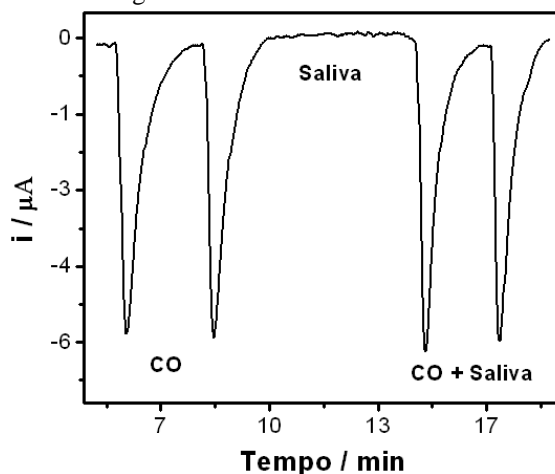
FIGURA 25: Gráficos contendo os sinais de corrente máxima obtido para -1,2 V. (A) Otimização do tempo de aplicação do potencial de -1,0 V testados em 300, 500, 600 e 900 ms. (B) Otimização do tempo de aplicação do potencial -1,2 V. Estudos feitos em FIA-MPA com injeções em triplicata de saliva diluída 10 vezes. Pulso de potencial gerador em +1,8 V por 400 ms e vazão de 3,0 mL min⁻¹ e alça de 300 µL.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 25 mostra que a incorporação do pulso de potencial de -1,0 V/ 600 ms e o aumento do tempo no E_C proporcionaram a eliminação de possíveis interferentes na amostra de saliva testada, que conseqüentemente iria interferir na determinação da CO pelo método proposto. No entanto, como a sensibilidade da detecção da CO no E_C pode diminuir em tempos maiores de aquisição da corrente, o estudo de interferentes foi novamente realizado com os novos parâmetros definidos, porém com a presença da CO (Figura 26).

FIGURA 26: Amperograma obtido por FIA-MPA com injeções em duplicata das soluções contendo apenas CO na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, apenas saliva tratada com NaOH diluída 10 vezes e por último os dois juntos. Análise aplicando um novo pulso de potencial em $-1,0 \text{ V}$ / 600 ms e o tempo do E_C alterado para 500 ms. As demais condições são as mesmas das Figuras 23 e 24.



Fonte: Próprio autor.

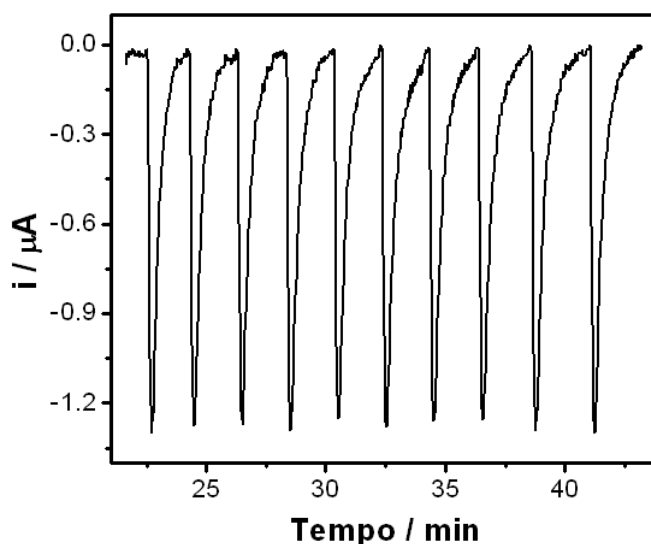
Na Figura 26 pode-se notar que a mudança dos parâmetros de detecção e o tratamento com NaOH foi capaz de eliminar a interferência da saliva analisada, podendo ser realizada a determinação da CO pelo método proposto. Essas mudanças, no entanto reduziu a sensibilidade do método especialmente por dois motivos: Primeiro que em $-1,0 \text{ V}$, parte do produto gerado da CO pela E_G já sofre um pouco de redução neste potencial (conforme Figura 20), diminuindo o número de espécies para serem detectadas no E_C . Pulsos de potencial menores que $-1,0 \text{ V}$ foram testados para eliminar os interferentes sem reduzir espécies da CO gerada no E_G , mas não mostraram eficiência na eliminação do sinal de interferência no E_C . O segundo motivo da diminuição da sensibilidade está intrínseco no tempo maior de aplicação do E_C , pois parte do produto gerado pela E_G pode estar difundindo-se da superfície do eletrodo, diminuindo assim a sensibilidade da análise da CO. No entanto, como pode ser visto na Figura 25, mesmo com a sensibilidade menor do método proposto nessas novas condições, a CO apresentou a mesma magnitude de sinal antes e após sua adição na amostra. A diferença da média das correntes obtidas pela injeção em duplicata da solução padrão de CO sozinha e com amostra da saliva foi de 1,16 % mostrando que a saliva não interfere no sinal da CO nas novas condições otimizadas. Todavia, como as amostras de saliva são complexas, a otimização do tempo de duração dos pulsos de potencial em $-1,0 \text{ V}$ e no E_C devem ser reavaliado para cada amostra de saliva analisada. No caso das amostras analisadas neste trabalho, os pulsos de potencial e os respectivos tempos de aplicação para determinar a CO ficaram definidos como:

- (1) 1,8 V por 400 ms. Geração do produto da CO à ser determinado.
- (2) 1,0 V por 50 ms. Amortecimento.
- (3) 0,0 V por 50 ms. Amortecimento.
- (4) -1,0 V por 600 ms. Redução de interferentes presentes na saliva.
- (5) -1,20 V por 500 ms. Detecção da CO.
- (6) -1,45 V por 300 ms. Limpeza do eletrodo.
- (7) 0,0 V por 50 ms. Amortecimento.
- (8) 1,0 V por 50 ms. Amortecimento.

4.2.6 Ensaios de repetibilidade e determinação da faixa linear de trabalho

Após eliminar a interferência da saliva na determinação da CO foi realizado um estudo de repetibilidade nas novas condições estabelecidas, analisando o DPR para a 10 injeções consecutivas de CO na concentração $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O DPR obtido para esta análise foi de 1,46%, sendo o amperograma apresentado na Figura 27.

FIGURA 27: Amperograma obtido pela detecção por FIA-MPA de 10 injeções consecutivas de CO $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Vazão utilizada de $3,0 \text{ ml min}^{-1}$ e alça de amostragem de $300 \mu\text{L}$.



Fonte: Próprio autor.

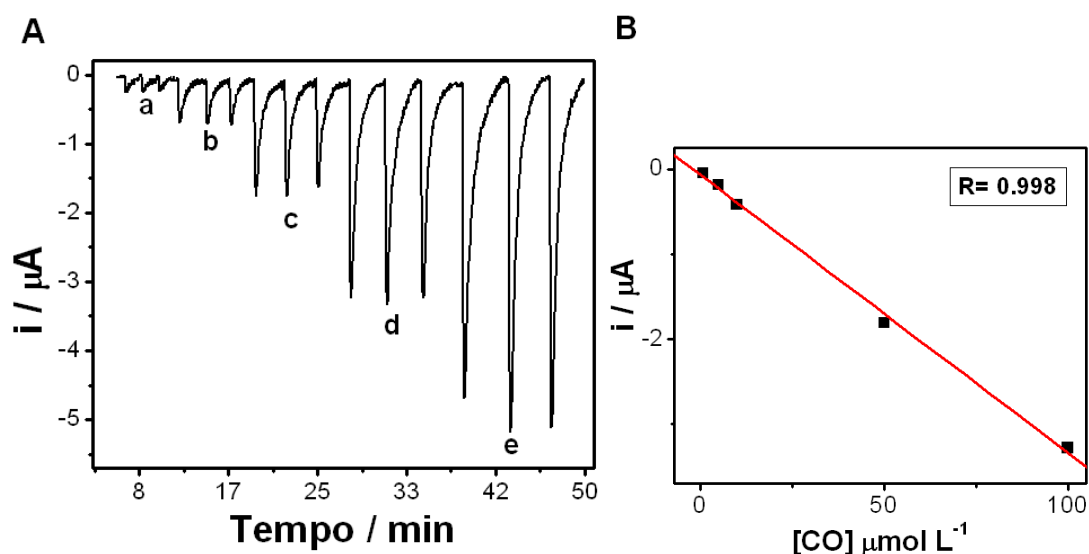
Esse resultado obtido para o estudo de repetibilidade mostra que o eletrodo de BDD não sofre contaminação ou passivação durante as análises, mostrando precisão para o método proposto. Essas vantagens do método podem ser decorrentes da estabilidade do eletrodo de BDD utilizado juntamente com a detecção amperométrica em fluxo. Esse sistema

garante que pulsos de limpeza possam ser aplicados melhorando a estabilidade do sinal eletroquímico.

4.2.7 Estudo da faixa linear e dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Após a otimização de todos os parâmetros foi feito o estudo da faixa linear de trabalho nas novas condições otimizadas, com injeções em triplicata da CO nas concentrações de 0,5; 5,0; 10; 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Apenas o sinal do processo catódico da CO foi monitorado (Figura 28A). A partir do FIAgrama para essas concentrações, foi obtido a curva de calibração com um coeficiente de regressão linear de 0,998, com a seguinte equação da reta: $I(A) = -6,67 \cdot 10^{-8} - 0.03268c$ (Figura 28B).

FIGURA 28: (A) FIAgrama obtido pelo sistema MPA-FIA de soluções padrão de CO nas concentrações de: (a) 0,8; (b) 5,0; (c) 10,0; (d) 50,0 e (e) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Vazão utilizada de 3,0 min^{-1} e alça de amostragem de 300 μL . (B) Curva de calibração.



Fonte: Próprio autor.

Através da curva foi calculado os limites de detecção e quantificação da maneira explicada na parte experimental, sendo estes valores de 0,18 e 0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente. Um indivíduo que consome até 10 cigarros pode atingir cerca de 70 ng ml^{-1} de CO na saliva, enquanto que, para o consumo de mais de 10 cigarros esse nível pode atingir até 283 ng ml^{-1} (DHAR, P., 2004). A quantidade de CO que discrimina o fumante ativo do passivo é de aproximadamente 12 ng ml^{-1} em amostras de saliva, sendo assim, o limite de detecção de 32 ng ml^{-1} do método apresentado serve apenas para ser aplicado em amostras de fumantes que

consomem muitos cigarros por dia, não podendo ser aplicado para diferenciar fumantes ativos e passivos.

4.2.8 Estudo de adição-recuperação

Para avaliar a interferência da matriz da amostra na determinação da CO, além da exatidão do método, foi realizado o teste de adição-padrão. A Tabela 3 apresenta os resultados desta análise mostrando que o método pode ser utilizado para determinar a CO sem interferência da matriz da saliva.

TABELA 3: Estudo de adição-padrão

Amostra	Adição de CO padrão ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Deteção da CO padrão ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(%)
Saliva	6,0	6,2	96,77

Fonte: Próprio autor.

4.3 Comparação entre os métodos para determinação da CO disponíveis na literatura e o FIA-MPA

Esse trabalho é o primeiro a apresentar um estudo eletroquímico da CO, além de propor a determinação desse composto em amostras de saliva por FIA-MPA. Outros métodos para determinar a CO estão disponíveis na Tabela 4, que apresenta também os limites de detecção em determinadas amostras biológicas (IAN, G. M.; PROCTOR, A. J.; PROCTOR, C. J., 1991; KUO, H.; YANG, J.; CHIU, M., 2002; DHAR, P., 2004; KATAOKA, H., 2009; LAFAY, F. *et al.* 2009).

TABELA 4: Métodos para detecção da CO em amostras e limites de detecção.

Método	Amostra	LD (ng/ml)
HPLC – UV	Urina	0.1
HPLC – Massas	Saliva	0.3
CG - Detector termoiônico	Urina	0.2
CG - Massas	Urina	0.8
CG -Nitrogênio/Fósforo	Soro	0.1
ELISA	Urina e saliva	0.4 à 0.5
CGL	Plasma, urina, saliva	0,1
RIA	Plasma e soro	0.1 à 0.5
RIA	Saliva e urina	10 à 15
MPA-FIA	Saliva	32

O método FIA-MPA para determinar a CO em amostras de saliva possui um LD de 32 ng ml⁻¹, sendo este, maior que o LD dos métodos disponíveis para este fim. A determinação da CO pelo método proposto se mostra vantajosa no entanto, em relação a determinação da nicotina pelos métodos eletroquímicos disponíveis para este fim. A Tabela 5 compara o método proposto por Suffredini e colaboradores para determinar nicotina por meio de VOQ utilizado eletrodo de BDD com a determinação da CO por MPA acoplado ao sistema FIA.

TABELA 5: Resultados para a determinação da nicotina e cotinina pelos métodos eletroquímicos disponíveis (SUFFREDINI, H. B. *et al.* 2005)

Método	Nicotina	Cotinina
	VOQ	MPA-FIA
Eletrodo de trabalho	BDD	BDD
Processos eletroquímicos	+1,3 V	+1,8 V e -1,2 V
LD	0,50 mg L ⁻¹	32,1 ng L ⁻¹

Fonte: SUFFREDINI, H. B. *et al.* 2005.

Com o objetivo de melhorar o LD para detecção de CO em amostras de saliva, testes de pré concentração da amostra foram realizados. O teste se baseou em um estudo realizado por Jacob e colaboradores para de pré concentração de CO em amostras de leite materno e saliva, utilizando diclorometano e posterior detecção por cromatografia líquida utilizando UV (JACOB, N.; GOLMARD, J. L.; BERLIN, I., 2015). Neste estudo o composto pré concentrado, no caso a CO, apresenta afinidade pela fase orgânica que é completamente evaporada. Dessa forma a CO é ressuspensa em um volume menor possibilitando a pré concentração da amostra em até 10 vezes.

O teste para avaliar a viabilidade desta pré concentração para análise no sistema FIA- MPA foi feito de forma semelhante ao estudo de interferentes. Foi realizada a injeção de três amostras em duplicata no sistema FIA, sendo a primeira amostra de CO $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato sem pré concentração, a segunda contendo apenas saliva, e a terceira com saliva contendo CO $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo que, as duas últimas amostras passaram pelo processo de pré concentração. Este estudo permitiu comparar o quanto o sinal de corrente referente ao processo catódico da CO seria aumentando pela pré concentração, além de permitir a possibilidade avaliar individualmente o sinal da saliva quando ela passasse pelo mesmo processo.

Os resultados deste estudo mostraram que houve de fato uma pré concentração da CO, porém, nesse caso a saliva apresentou um sinal de redução que pode ser decorrente da pré concentração de compostos presentes na saliva em quantidade que antes não interferia na análise da CO. Para o método proposto a CO não pode ser determinada por meio desta pré concentração, pois o sinal de redução apresentado pela saliva pode estar interferindo no sinal observado para a CO.

5.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresentou pela primeira vez um estudo do comportamento eletroquímico da CO e propôs um método eletroanalítico para a quantificação da desse composto em amostras de saliva.

Através do estudo sobre o comportamento eletroquímico da CO por meio de VC utilizando o eletrodo de BDD foi possível observar dois processos, um anódico em +1,8 V e um catódico em -1,2 V. Os estudos com base nas voltametrias de onda quadrada e varredura permitiram determinar que 2 elétrons estão envolvidos nas reações da CO nas condições estabelecidas. O método proposto por FIA-MPA permitiu a quantificação da CO sendo promissor para ser aplicado em amostras de saliva de fumantes ativos.

Os estudos realizados para eliminar a interferência de compostos presentes na saliva foi satisfatório visto que, para o estudo de adição padrão realizado obteve-se 96,8% de recuperação da amostra. Comparado com os métodos atualmente disponíveis o limite de detecção alcançado pode ser considerado alto, sendo suficiente apenas para monitorar fumantes ativos. O método proposto, porém, apresenta a vantagem de ser simples, rápido e de baixo custo.

O desenvolvimento deste trabalho mostra a potencialidade para aplicação da MPA acoplada ao sistema FIA para detecção da CO em amostras de saliva. Os resultados apresentados abrem perspectivas para novos estudos envolvendo a pré-concentração de amostras de forma a diminuir o LD ampliando a possibilidade de aplicação o método para monitorar fumantes ativos e passivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIGRAM, E. J.; ZHANG, D.; MAILLARD, G.; LUTON, D.; ANDRÉ, J.; OURY, J.F. **Maternal smoking during pregnancy and nicotine and cotinine concentrations in maternal and neonatal hair.** International Journal of Obstetrics and Gynaecology, v. 109, p. 909–911, Ago, 2002.
- ANGUS, J. C.; PLESKOV, Y. V.; EATON, S. C. **Electrochemistry of diamond. Capítulo 3** Disponível em : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0080878404800152>> Acesso em: mar, 2016.
- APINAN, R.; CHOEMUNG, A. KESARA, B. **A Sensitive HPLC-ESI-MS-MS Method for the Determination of Cotinine in Urine.** Journal of Chromatographic Science. Vol. 48, July 2010.
- BAJAJ, M. **Nicotine and Insulin Resistance: When the Smoke Clears.** Diabetes, v. 61, dez, 2012.
- BANDA, S. R. G.; DE CARVALHO, A. E. ANDRADE, L. S.; FILHO, R. C. R.; AVACA, L. A. **On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments.** J Appl Electrochem v. 40, p.1817–1827, 2010.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications.** Wiley New York. 1980.
- BAUMANN, F.; REGENTHALA, R.; GUERREROUB, B.; HEGERLB, U.; PREISS, R. **Determination of nicotine and cotinine in human serum by means of LC/MS.** Journal of Chromatography B. v. 878, p. 107–111, 2010.
- BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB, P. **Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. Handb Exp Pharmacol.** v. 192, p.. 29–60, 2009.
- BENOWITZ, N. L. **Nicotine and Smokeless Tobacco. A cancer journal for clinicians.** v. 38, ago, 1988.
- BERNERT, J. Y.; HARMON, T. L.; SOSNOFF, C. S.; MCGUFFREY, J. E. **Use of Cotinine Immunoassay Test Strips for Preclassifying Urine Samples from Smokers and Nonsmokers Prior to Analysis by LC-MS-MS.** Journal of Analytical Toxicology, v. 29, 2005.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. **Electrochemistry: principles, methods, and applications,** 1993.
- BYRD, G. D.; DAVIS, R. A.; OGDEN, M. W. **Ogden A Rapid LC-MS-MS Method for the Determination of Nicotine and Cotinine in Serum and Saliva Samples from Smokers: Validation and Comparison with a Radioimmunoassay Method.** Journal of Chromatographic Science, v. 43, Mar, 2005.

CARRENO, M. C.; RIBAGORDA, M. **Anodic oxidation of N-protected 4-methoxy anilines: improved synthesis of quinone imine acetals.** The Journal of organic chemistry, v. 65, p. 1231-1234. 2000.

CHENG, K.; ZHAO, W.; LIU, S.; SUI, G. **Microfluidic immunoassay for rapid detection of cotinine in saliva.** Biomed Microdevices, v. 15, p. 949–957, 2013.

DE BARROS, R. C. M.; RIBEIRO, M. C.; AN-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. S.; SERRANO, H. P. **Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico produção e caracterização.** Quim. Nova, v. 28, N. 2, p. 317-325, 2005.

DE SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, A. V.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, A. S. **Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações.** Quim. Nova, v. 27, N. 5, p. 790-797, 2004.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. **Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos.** Quim. Nova, v. 26, N. 1, p. 81-89, 2003.

DHAR, P. **Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 35, p. 155–168, 2004.

DOS SANTOS, W. P. T.; ALMEIDA, E. G. N.; FERREIRA, E.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M. **Simultaneous Flow Injection Analysis of Paracetamol and Ascorbic Acid with Multiple Pulse Amperometric Detection.** Electroanalysis, Vol. 20, 1878 – 1883, 2008.

DOS SANTOS, W. P. T.; GIMENES, D. T.; ALMEIDA, E. G. N.; EIRAS, S. P.; ALBUQUERQUERQUE, Y. D. T.; RICHTER, E. M. **Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyrone and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations.** J. Braz. Chem. Soc., v. 20, N. 7, p. 1249-1255, 2009.

DOS SANTOS, W. T. P.; GIMENES, T. G.; RICHTER, E. M.; ANGNES, L. **Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações.** Quim. Nova, v. 34, N. 10, p. 1753-1761, 2011.

FATOUROS, N.; KRULIC, D. **Contribution to the study of square wave voltammetry in the case of simple irreversible reactions.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 443, p. 262-265, 1998.

FUJISHIMA, A.; YA, E.; RAO, T. N.; TRYK, D. A. **Diamond electrochemistry.** Elsevier, 2005.

GILMAN, G. A.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** Rio de Janeiro. 2003.

GIMENES, T. D.; DOS SANTOS, W. T. P.; TORMIN, T. F.; MUNOZ, A. A. R.; RICHTER, E. M. **Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid.** Electroanalysis, v. 22, p. 74 – 78, 2010.

GUEDES, T. J.; ALECRIM, M. F.; OLIVEIRA, F. M.; LIMA, A. B.; BARBOSA, S. L.; DOS SANTOS, W. T. S. **Determination of prazosin in pharmaceutical samples by flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection using boron-doped diamond electrode.** J Solid State Electrochem, 2015.

HEALTH AND SERVICES. **Surgeon General's Report. The Health Consequences of Smoking.** Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Office of Smoking and Health, 2004.

HARRISON, D. S.; JOHNSON, D. C. **Pulsed Amperometric Detection Based on Direct and Indirect Anodic Reactions: A Review.** Electroanalysis, p. 189- 197, 1989.

HECHT, S. S.; HOCHALTER, B.; VILLALTA, P. W.; MURPHY, S. E. **Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: Formation of a lung carcinogen precursor.** PNAS, v. 97, p. 12493–12497, Novembro, 2000.

HUKKANEN, J.; JACOB, P.; BERNOWITZ, N. L. **Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine.** Pharmacological Review, v.. 57, p. 79–115, 2005.

IAN, G. M.; ANDERSON, J. P.; CRISTOPHER, J. P. **Comparison of the Measurement of Serum Cotinine Levels by Gas Chromatography and Radioimmunoassay.** Analyst. v. 116. 1991.

IAN, G. M.; PROCTOR, A. J.; PROCTOR, C. J. **Comparison of the Measurement of Serum Cotinine Levels by Gas Chromatography and Radioimmunoassay.** Analyst, v. 116, 1991.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE (2014). **Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas: Brasil, grandes regiões e unidades da federação,** Rio de Janeiro, 2013.

JACOB, N.; GOLMARD, J. L.; BERLIN, I. **Relationships between nicotine and cotinine concentrations in maternal milk and saliva.** Acta Paediatrica, v. 104, p. 360–366, 2015.

JIDAO, W.; FENGBIN, L.; HAOSHENG, C.; DARONG, C. **The electron transfer behavior of the hydrogen-terminated boron-doped diamond film electrode.** Materials Chemistry and Physics, v. 115,p. 590–598, 2009.

JUNIOR, A. C. L.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; DOS SANTOS, A. S.; FRANCO, D. L.; DOS SANTOS, W. P. T. **Determination of Sildenafil Citrate (Viagra®) in Various Pharmaceutical Formulations by Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection.** v. 23, 2012.

KATAOKA, H.; INOUE, R.; YAGI, K.; SAITO, K. **Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 49, p. 108–114, 2009.

KIM, Y.; KIM, Y. K.; KOH, H. **Effects of smoking on trace metal levels in saliva.** Oral Diseases, v.16, p. 823–830, 2010.

KOBAYASHI, N.; BANZONO, E.; SHIMODA, Y.; OYAMA, H. KUNIHIRO, T.; MORITAA, I. **A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for human urinary cotinine to monitor tobacco smoke exposure.** Analytical Methods, Ago, 2011.

KOH, D. S.; KOH, G. C. **The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine.** Occup Environ Med, v. 64, p. 202–210, 2007.

KOBAYASHI, N.; BANZONO, E.; SHIMODA, Y.; OYAMA, H.; KUNIHIRO, T.; MORITA, I.; OHTAB, M. **A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for human urinary cotinine to monitor tobacco smoke exposure.** Analytical Methods, v. 3, p. 1995–2002, 2011.

KOREN, G.; BLANCHETTE, P.; LUBETZKY, A.; KRAMER, M. **Hair Nicotine: Cotinine Metabolic Ratio in Pregnant Women: A New Method to Study Metabolism in Late Pregnancy.** Ther Drug Monit, v. 30, Abri, 2008.

KOWALSKI, P.; MARSZALL, M.; OLE, I.; CZARNOWSKI, W. **Comparative Evaluation of CE and HPLC for Determination of Cotinine in Human Urine.** Chromatographia, v. 66, Set, 2007.

KUO, H.; YANG, J.; CHIU, M. **Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay.** Journal of Chromatography B, v. p. 768, 297–303, 2002.

KUOA, H. W.; YANGA, J. S.; CHIU, M. C. **Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay.** Journal of Chromatography B, v. 768, p. 297–302, 2002.

LAFAY, F.; VULLIER, E.; MAGDELEINE, M.; WATON, F. **Contribution of microextraction in packed sorbent for the analysis of cotinine in human urine by GC–MS.** Anal Bioanal Chem v. 396, p. 937–941, 2010.

LIMA, A. B.; CHAVES, S. C.; DA SILVA, L. M. PEREIRA, P. F.; RICHTER, E. M.; DOS SANTOS, W. T. P. **Determinação de nimesulida por análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos.** Quim. Nova, v. 36, N. 9, p. 1296–1302, 2013.

LINDBOHM, M. L.; SALLMÉM, M.; TASKINEN, H. **Effects of exposure to environmental tobacco smoke on reproductive health.** Scand J Work Environ Health, v. 28, p. 84–96, 2002.

LJUNGBERG, L. U.; PERSSON, K.; ERIKSSON, A. C.; GREEN, H.; WHISS, P. A. **Effects of nicotine, its metabolites and tobacco extracts on human platelet function in vitro.** Toxicology in Vitro, v. 27, p. 932–938, 2013.

LOURENÇÃO, B. C.; **Eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação voltamétrica/ amperométrica de anti-helmínticos e anti- hipertensivos.** Tese de Doutorado, 2014.

LUMIKARI, L. M.; JOHANSSON, I.; VILJA, P.; SAMARANAYAKE, L. P. **Newer saliva collection methods and saliva composition: a study of two Salivette® kits.** Oral Diseases, 1995.

MANTILLA, M. E.; MENDIETA, H. **Tiocianato sérico: um marcador bioquímico para discriminar fumadores de não fumadores.** Rev. Cubana Hig Epidemiol, v. 37, 1999.

MIDDLETON, E. T.; MORICE, A. H. **Breath Carbon Monoxide as an Indication of Smoking Habit.** 1999. Disponível em: < <http://journal.publications.chestnet.org/>> Acesso em: 01 Dez, 2016.

MIRCESKI, V.; GULABOSKI, R.; LOVRIC, M.; BOGESKI, I.; KAPPL, R.; HOTHD, M. **Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress.** Electroanalysis, v. 25, p. 2411 – 2422, 2013.

NANCY, J.; HOFFMANN, D.; HOFFMANN, H. **Analysis for Nicotine and Cotinine in Hair to Determine Cigarette Smoker Status.** Clinical chemistry, v. 31, 1985.

O'DONNELL, J. F.; MANN, C. K.; **Controlled-potential oxidation of aliphatic amides.** Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. v. 13, p. 157-162. 1967.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **"A WHO/The Union monograph on TB and tobacco control: joining efforts to control two related global epidemics."** Geneva: WHO. 2007.

PACHECO, W. F.; SEMANN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. **Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos.** Rev. Virtual Quim., v. 5, p. 516-537. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/index.php/rvq/article/viewDownloadInterstitial/380/345> . Acesso em: 06 abril 2016.

PAMPLONA, P.; MENDES, B. **Estratégia de tratamento do tabagismo na DPOC.** Revista portuguesa de pneumologia. v.15, Dezembro, 2009

PANIZZA, M.; CERISOLA, G. **Application of diamond electrodes to electrochemical processes.** Electrochimica Acta v. 51, p. 191–199, 2005.

PARK, S.; LEE, D.; PARK, J.; LEE, Y. T.; CHUNG, J. **A sensitive enzyme immunoassay for measuring cotinine in passive smokers.** Clinica Chimica Acta, v. 411, p.1238–1242, 2010.

PILLER, M.; GILCH, G.; SCHERER, G.; SCHERER, M. **Simple, fast and sensitive LC–MS/MS analysis for the simultaneous quantification of nicotine and 10 of its major metabolites.** Journal of Chromatography B, p. 951–952, 2014.

ROSEMBERG, J.; ROSEMBERG, A. M. A.; DE MORAES, M. A. **Nicotina: droga universal**. Secretaria da Saúde do estado de São Paulo. Centro de Vigilância. Epidemiológica, 2003.

ROSS, S. D.; FINKELSTEIN, M.; PETERSEN, R. C. **Anodic Oxidations. III. The Reaction Mechanism in the Electrochemical Acetoxylation and Alkoxylation of N, N-Dimethylamides**. Journal of the American Chemical Society. v. 88, p. 4657-4660, 1966.

SANTOS, P. P. A.; INGLESIAS, D. P. P.; SOUZA, E. L.; FREITAS, R. A.; GALVÃO, H. C.; **Saliva: Métodos Atuais para Coleta e Obtenção da Amostra**. Fac. Odontol. Porto Alegre, Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p. 95-98, Dez, 2007.

SHIN, H.; KIM, J.; SHIN, Y.; JEE, S. H.; **Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chromatography–mass spectrometry**. Journal of Chromatography B, v. 769, p. 177–183, 2002.

SILVA, S. T.; MARTINS, M. C.; FARIA, F. R.; COTTA, R. M. M. **Combate ao Tabagismo no Brasil: a importância estratégica das ações governamentais**. Ciência e Saúde Coletiva, v. 19, p. 539-552, 2014.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; FILHO, R. C.; AVACA, L. A. **Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment**. Electrochimica Acta v. 49, p. 4021–4026, 2004.

SUFFREDINI, H. B.; SANTOS, M. C.; DE SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MELLO, P. H.; HONÓRIO, K. M.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S.; DA SILVA, A. B. F. **Electrochemical Behavior of Nicotine Studied by Voltammetric Techniques at Boron-Doped Diamond Electrodes**. Analytical Letters, v. 38, p. 1587–1599, 2005.

TANG, E. A.; AL-DELAIFY, W. K.; DAVID, L.; BENOWITZ, N.; BERNERT, J. T.; KIM, S.; SAMET, J. M. HECHT, S. S. **Assessing secondhand smoke using biological markers**. Disponível em: < <http://tobaccocontrol.bmj.com> > Acesso em: 06 out. 2015.

TAMASHIRO, E.; COHEN, N. A.; PALMER, J. N.; LIMA, W. T. A. **Efeitos do cigarro sobre o epitélio respiratório e sua participação na Rinossinusite Crônica**. Braz J Otorhinolaryngol. v. 75, p. 903-7. 2009.

TOGHILL, K. E.; CAMTON, R. G. **Metal Nanoparticle Modified Boron Doped Diamond Electrodes for Use in Electroanalysis**. Electroanalysis, v. 22, p. 9–14, Dez, 2009.

TRULLÉN, P. A.; BARTOLOMÉ, C. B.; BARRUECO, M. HERRERO, I. JIMÉNEZ, C. A. **Nuevas perspectivas en el diagnóstico y evolución del consumo de tabaco: marcadores de exposición**. Prevención Del tabaquismo, v. 8, Dez, 2006.

VITOR, V. R.; MARTINS, M. C. G.; FIGUEIREDO, E. C.; MARTINS, I. **Application of molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for salivary cotinine**. Anal Bioanal Chem v. 400, p. 2109-2117, 2011.

SANTOS, S. R.; STUDART, F. S.; IAMONTI, V. **Marcadores biológicos para o tabagismo.** Pneumologia Paulista, v. 21, 2008.

STOCES, M.; SVANCARA, I. S. **Electrochemical Behavior of Nicotine at Unmodified Carbon Paste Electrode and Its Determination in a Set of Refilling Liquids for Electronic Cigarettes.** Electroanalysis, v. 26, p. 2655 – 2663, 2014.

SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, Fundamentos de química analítica. 8 ed., 1979.

WANG, Y.; JI, J.; LIU, Y. L.; DENG, X.; HE, Q. **Passive Smoking and Risk of Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies.** v. 8, jul, 2013.

YOSHIOKA, N.; DOHI, Y.; YONEMASU, K. **Development of a Simple and Rapid ELISA of Urinary Cotinine for Epidemiological Application.** v. 3, p. 12-16, Abril, 1998.